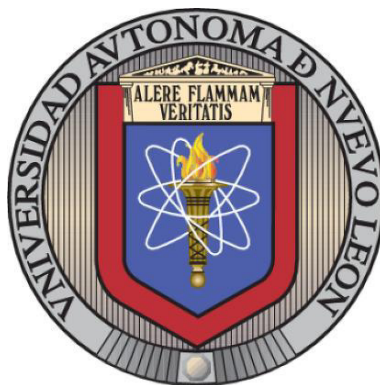


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**OPTIMIZACIÓN DE LA SECUENCIA SEÑAL PARA LA PRODUCCIÓN DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL PERIPLASMA DE *ESCHERICHIA*
COLI MARCADAS CON SMBP**

POR

BRYAN DANIEL SANTOS RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA**

Julio, 2017

OPTIMIZACIÓN DE LA SECUENCIA SEÑAL PARA LA PRODUCCIÓN DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL PERIPLASMA DE *ESCHERICHIA COLI*
MARCADAS CON SMBP

Revisión de la tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Asesor de la tesis

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

Asesor de la tesis

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Asesor de la tesis

Dr Ulrico Javier López Chuken

Asesor de la tesis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron presentes durante la realización de este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A la escuela de graduados de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por las instalaciones prestadas, así como materiales y reactivos brindados. Al CONACyT por las becas y ayuda económica.

Agradezco a mi asesor el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por todo lo que aprendí de él y por todo al apoyo brindado durante la elaboración del proyecto, gracias por la paciencia y por los consejos.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Pilar Morales, el Dr. Rubén Morones y el Dr. Ulrico López, por todas sus observaciones, correcciones y tiempo durante la elaboración de este trabajo.

También agradezco a la coordinadora del posgrado en Microbiología Aplicada la Dra. María Elena Cantú, por toda su atención, consejos y apoyo.

A todos los profesores del posgrado que compartieron conmigo y mis compañeros todos sus conocimientos en las aulas de clase y que nos sirvieron para la realización de nuestros proyectos.

A mis amigos de la licenciatura, por todos los consejos brindados y por estar ahí siempre que los necesité.

A mi querida familia por apoyarme siempre en mis decisiones, a mis padres Julio César Santos Guerra y Laura Ofelia Rodríguez Núñez, por darme el empujón cada día para poder salir adelante y por toda la educación que me brindaron para ser la persona que soy hoy, muchas gracias.

Por último, quiero agradecer a Ana Cecilia Cerda Torres, gracias por apoyarme siempre en mis decisiones, por levantarme cuando creía que no se podía, por tu paciencia y dedicación, por tus consejos, por tu tiempo y sobre todo por quererme tanto.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 2.....	21
2. ANTECEDENTES	21
2.1. SmbP y CusF como proteínas de fusión	21
2.2. Expresión de proteínas con diferentes péptidos señal en el periplasma de <i>E. coli</i>	22
2.3. Predicción del péptido señal y las regiones n, h, c.....	25
2.4. Choque osmótico para la extracción de proteínas periplásmicas	26
CAPÍTULO 3.....	30
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	30
3.1. Objetivo General	30
3.2. Objetivos específicos	30
3.3. Hipótesis	30
CAPÍTULO 4.....	31
4. METODOLOGÍA	31
4.1. Diseño de insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP	31
4.2. Amplificación de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p	31
4.3. Construcción de plásmidos	33
4.3.1. Construcción del plásmido pET30a-Ent	33
4.3.1.1. Digestión del gen de la enteroquinasa y el plásmido pET30a.....	33
4.3.1.2. Ligación del plásmido pET30a e inserto de la enteroquinasa	34
4.3.1.3. Transformación de pET30a-Ent en <i>E. coli</i> DH5a.....	34
4.3.1.4. Extracción de ADN plasmídico	34
4.3.1.5. Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas	34
4.3.2. Construcción de pET30a-CusFps-SmbP-RFP, pET30a-PelBps-SmbP-RFP y pET30a-CusF3H+p-RFP.....	35
4.3.2.1. Digestión del plásmido pET30a-CusFp-RFP e insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p.....	35

4.3.2.2.	Ligación del plásmido pET30a-RFP e insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p	36
4.3.2.3.	Transformación de pET30a-CusFps-SmbP-RFP, pET30a-PelBps-SmbP—RFP y pET30a-CusF3h+-RFP en <i>E. coli</i> DH5 α	37
4.3.2.4.	Extracción de ADN plasmídico	37
4.3.2.5.	Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas	38
4.3.3.	Construcción del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-rhGM-CSF	38
4.3.3.1.	Digestión del gen rhGM-CSF y el plásmido pET30a-PelBps-SmbP	38
4.3.3.2.	Ligación del plásmido pET30a-PelBps-SmbP e inserto rhGM-CSF	39
4.3.3.3.	Transformación de pET30a-PelBps-SmbP-rhGM-CSF en <i>E. coli</i> DH5 α	40
4.3.3.4.	Extracción de ADN plasmídico	40
4.3.3.5.	Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas	40
4.4.	Expresión de proteínas	41
4.4.1.	Transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	41
4.4.2.	Expresión piloto de proteínas.....	41
4.4.3.	Obtención de la fracción soluble e insoluble	42
4.4.4.	Análisis de las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE.....	42
4.4.5.	Expresión piloto para la extracción de proteínas periplásmicas	43
4.4.6.	Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico	43
4.4.7.	Escalamiento de la expresión a 1 L.....	44
4.5.	Microscopía de fluorescencia.....	44
4.6.	Purificación de proteínas.....	45
4.6.1.	Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus.....	45
4.6.2.	Diálisis para la remoción de imidazol.....	46
4.7.	Cuantificación de proteínas por el método Bradford	46
4.8.	Remoción de la proteína de fusión.....	46
4.9.	Cuantificación de RFP por fluorescencia.....	47
CAPÍTULO 5.....		48
5. RESULTADOS.....		48
5.1.	Diseño de insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP	48
5.2.	Amplificación de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p	49
5.3.	Clonación molecular de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p	50
5.4.	Clonación molecular del gen de la enteroquinasa.....	51

5.5.	Clonación molecular del gen rhGM-CSF	52
5.6.	Expresión piloto de proteínas recombinantes y análisis por SDS-PAGE de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+-RFP y SmbPp-RFP	53
5.7.	Extracción de proteínas periplásmicas de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP por el método lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE	56
5.8.	Expresión piloto de la enteroquinasa recombinante y análisis por SDS-PAGE	59
5.9.	Extracción periplásmica de la enteroquinasa recombinante por el método lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE	60
5.10.	Expresión piloto de PelBps-SmbP-CSF2 y análisis por SDS-PAGE	62
5.11.	Extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por el método lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE	62
5.12.	Microscopía de fluorescencia.....	64
5.13.	Purificación de PelBps-SmbP-RFP por cromatografía IMAC	66
5.14.	Cuantificación de PelBps-SmbP-RFP por el método Bradford	71
5.15.	Corte de la proteína de fusión PelBps-SmbP de RFP con enteroquinasa y análisis por SDS-PAGE	72
5.16.	Purificación de CusFps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP por cromatografía IMAC	73
5.17.	Purificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por cromatografía IMAC	76
5.18.	Cuantificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por el método Bradford	79
5.19.	Corte de la proteína de fusión PelBps-SmbP de rhGM-CSF con enteroquinasa y análisis por SDS-PAGE	80
5.20.	Cuantificación de RFP por espectrofotometría de fluorescencia	81
CAPITULO 6.....		84
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS		84
CAPITULO 7.....		93
7. CONCLUSIONES		93
CAPITULO 8.....		95
8. PERSPECTIVAS		95
CAPITULO 9.....		96
9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS		96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+	32
Tabla 2. Secuencia de aminoácidos del péptido señal de las proteínas SmbP, CusF y PelB.....	48
Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de los insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP.....	49
Tabla 4. Pesos del sedimento celular de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP para la extracción de proteínas periplásmicas. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin transformar.	56
Tabla 5. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de la enterocinasa. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin transformar.	61
Tabla 6. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-CSF2. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin transformar.....	63
Tabla 7. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-RFP. ...	66
Tabla 8. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.	71
Tabla 9. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de SmbPp-RFP y CusFps-SmbP-RFP.	74
Tabla 10. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF.	77
Tabla 11. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.....	79
Tabla 12. Datos de la curva de calibración para la cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia	81
Tabla 13. Disposición de los residuos generados	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la formación de enlaces disulfuro en el periplasma [13]	15
Figura 2. Representación esquemática de la ruta SecB dependiente, SRP dependiente y la ruta Tat [15].....	16
Figura 3. Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el gen de la proteína CusF3H+p y PelBps-SmbP contenidos en el plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.....	49
Figura 4. Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el gen de la proteína CusFps-SmbP contenido en el plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.....	50
Figura 5. PCR de confirmación de las construcciones realizadas. En el carril 5 se muestra el marcador GeneRuler 1kb DNA ladder. En el carril 1 y 2 se muestra la amplificación de las colonias de CusFps-SmbP-RFP. En el carril 3,4 y 6 se muestra la amplificación de las colonias de PelBps-SmbP-RFP. En el carril 7-9 se muestra la amplificación de las colonias de CusF3H+p-RFP.....	51
Figura 6. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión del gen de la enteroquinasa contenido en al plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.	52
Figura 7. Gel de agarosa al 0.7% del PCR de confirmación del gen de la enteroquinasa en el vector pET30a. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.....	53
Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% del PCR de confirmación del gen rhGM-CSF en el plásmido pET30a-PelBps-SmbP. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.	54
Figura 9. Pellets de la expresión piloto de proteínas en <i>E. coli</i> BL21(DE3) a 25 °C durante 16 horas.....	54
Figura 10. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de proteínas. Fracción soluble de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	55
Figura 11. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de proteínas. Fracción insoluble de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+-RFP y SmbPp-RFP. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	55
Figura 12. Sedimentos celulares de las expresiones antes de ser sometidos al método lisozima/choque osmótico. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.	57
Figura 13. Método lisozima/choque osmótico. a) Fracciones hipertónicas e b) hipotónicas. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.	57
Figura 14. Sedimentos celulares de las expresiones después de ser sometidos al método lisozima/choque osmótico. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.	58
Figura 15. Método lisozima/choque osmótico. a) Fracciones hipertónicas e b) hipotónicas. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP. Las fracciones se observaron en un transiluminador de UV.....	58
Figura 16. SDS-PAGE 12% de la extracción de proteínas periplásmicas. Carril 1-5: fracciones hipertónicas. Carril 7-11: fracciones hipotónicas. Carril 1 y 7: Control negativo <i>E. coli</i> BL21(DE3). Carril 2 y 8: CusFps-SmbP-RFP. Carril 3 y 9: PelBps-SmbP-RFP. Carril 4 y 10:	

CusF3H+p-RFP. Carril 5 y 11: SmbP-RFP. Carril 6: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.....	59
Figura 17. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de la enteroquinasa recombinante. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	60
Figura 18. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de la enteroquinasa recombinante. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	61
Figura 19. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	62
Figura 20. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó <i>E. coli</i> BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	64
Figura 21. Análisis de la expresión de RFP con las diferentes proteínas de fusión por microscopía de fluorescencia. Campo claro: a) <i>E. coli</i> BL21(DE3). Fluorescencia: b) <i>E. coli</i> BL21(DE3), c) SmbPc-RFP, d) CusFps-SmbP-RFP, e) PelBps-SmbP-RFP, f) CusF3H+-RFP, g) SmbPp-RFP.	65
Figura 22. Columna HiTrap TM IMAC FF de 5 mL con PelBps-SmbP-RFP unida.	67
Figura 23. Fracciones de elución obtenidas que mostraron coloración de rosa a rojo cereza.....	68
Figura 24. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.	68
Figura 25. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-RFP.....	69
Figura 26. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 5-15: Fracciones de elución.	70
Figura 27. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-RFP por elución con gradiente.....	70
Figura 28. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm para PelBps-SmbP-RFP.	72
Figura 29. SDS-PAGE 15% de la remoción de la proteína PelBps-SmbP de RFP después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se tomaron muestra antes y después del corte y posterior a la purificación por resina Profinity TM IMAC cargada con iones níquel.....	73
Figura 30. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de CusFps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.	75
Figura 31. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de SmbPp-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-10: Fracciones de elución.	75
Figura 32. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para CusFps-SmbP-RFP con elución por gradiente.....	76
Figura 33. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPp-RFP.	76
Figura 34. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción periplásmica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.	78

Figura 35. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-rhGM-CSF2 con elución por gradiente.....	78
Figura 36. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm para PelBps-SmbP-rhGM-CSF.	79
Figura 37. SDS-PAGE de la remoción de la proteína PelBps-SmbP de rhGM-CSF después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se tomaron muestra antes y después del corte y posterior a la purificación por resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel.....	80
Figura 38. Gráfica de la curva de calibración de RFP a 585 nm de longitud de onda de emisión.	82

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> , para expresión de proteínas
bp	Pares de bases
BSA	Albumina de suero bovino (Bovine serum albumin)
CtxB	Subunidad B de la endotoxina del cólera (Cholera toxin B subunit)
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> , para producción y mantenimiento de ADN recombinante
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
Dsb	Tiol oxidorreductasa
DsbA	Tiol oxidorreductasa A
DsbB	Tiol oxidorreductasa B
DsbC	Tiol oxidorreductasa C
DsbD	Tiol oxidorreductasa D
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ent	Enteroquinasa
FhuD	Proteína de unión a ferricromo
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrofagos
GST	Glutación-S-Transferasa
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
Kbp	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LamB	Maltoporina
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
LTIIb	Enterotoxina labil al calor IIb (Heat-labil enterotoxin IIb)
M	Molar
MalE	Proteína de unión a maltosa
mAu	Miliunidades de absorbancia
MauC	Amicianina
MBP	Proteína de unión a maltosa
Met	Metionina
mg	Miligramos

MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPa	Megapascuales
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
OmpA	Proteína de membrana externa A (Outer membrane protein A)
OsmY	Proteína Y osmóticamente inducible
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PelB	Pectato liasa B
Phe	Fenilalanina
PhoA	Fosfatasa alcalina
pmoles	Picomoles
ps	Peptido señal
RFP	Proteína roja fluorescente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales (Small metal binding Protein)
SmbPc	SmbP citoplásmica
SmbPp	SmbP periplásmica
SRP	Partícula de reconocimiento de señal (Signal Recognition Particle)
SUMO	Pequeño modificador de tipo ubiquitina (small ubiquitin-like modifier)
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
Trp	Triptofano
U.V.	Luz ultravioleta
Val	Valina
VEGFR2 D3	Dominio simple 3 del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Bryan Daniel Santos Rodríguez

Fecha de Graduación: Junio, 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Optimización de la secuencia señal para la producción de proteínas recombinantes en el periplasma de *Escherichia coli* marcadas con SmbP

Número de páginas: 102

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en
Microbiología Aplicada**

Área de Estudio: Ingeniería Genética

Propósito y Método de Estudio: El uso de proteínas de fusión ha facilitado la producción de proteínas recombinantes ya que le confieren ciertas características a la proteína de interés para producir proteínas solubles, biológicamente activas y facilitar los procesos de purificación.

SmbP es una proteína de 9.9 kDa aislada del periplasma de *Nitrosomonas europea* que ha sido utilizada como proteína de fusión para la expresión de diversas proteínas en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli*, sin embargo, los niveles de expresión periplásmica han sido bajos comparados con la proteína de fusión CusF.

Buscando mejorar los niveles de expresión en el periplásmica de SmbP se planteó intercambiar su secuencia señal nativa por la de las proteínas CusF y PelB con la finalidad de mejorar el transporte al periplasma de *E. coli*.

La metodología consistió en: 1) Amplificación de los genes de interés con sus modificaciones, 2) Construcción de plásmidos, 3) Transformación de *E. coli* DH5 α , 4) Extracción del ADN plasmídico, 5) Análisis confirmatorio por PCR, 6) Transformación de *E. coli* BL21(DE3), 7) Expresión de proteínas, 8) Purificación por cromatografía de

afinidad con iones metálicos inmovilizados, 9) Cuantificación de la proteína reportera RFP.

Contribuciones y conclusiones: en este estudio se obtuvieron las diferentes construcciones de plásmidos conteniendo los genes de interés, entre ellos el de las proteínas CusFps-SmbP y PelBps-SmbP como proteínas de fusión y RFP como proteína reportera. Así mismo se utilizó un plásmido conteniendo el gen de SmbPp nativa con RFP para comparar los niveles de expresión periplásmica.

Se realizó el análisis de la expresión mediante microscopía de fluorescencia mostrando que CusFps-SmbP-RFP y PelBps-SmbP-RFP mostraron mayor intensidad de fluorescencia que SmbPp-RFP. Además, se pudo observar una tendencia de acumulación de la proteína en los polos de la bacteria lo cual nos indica que nuestra proteína se encuentra localizada en el espacio periplásmico, sin embargo, debido a la baja intensidad de fluorescencia de SmbPp-RFP no se pudo apreciar este fenómeno.

Se cuantificaron los niveles de RFP utilizando espectroscopía de fluorescencia realizando una curva de calibración obteniendo mayor rendimiento utilizando PelBps-SmbP (7.93 mg por 1 L de cultivo) comparado con CusFps-SmbP (6.72 mg por 1 L de cultivo) y SmbPp (0.0068 mg por 1 L de cultivo).

Por último, se utilizó la proteína PelBps-SmbP para expresar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos obteniendo buenos niveles de expresión y pureza.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Hace décadas, las proteínas surgieron como una nueva clase de fármacos con una gran cantidad de productos en el mercado. La ingeniería de proteínas por medio de un diseño racional o evolución molecular permite desglosar la relación estructura-función de proteínas y la generación de nuevas proteínas con modificaciones en su actividad o con propiedades completamente nuevas [1].

Comparado con la producción de polipéptidos químicamente sintéticos, los polipéptidos biosintéticos han atraído mucha atención debido a sus ventajas, tales como bajo costo, alta actividad específica y la posibilidad del control a nivel molecular [2]. Sin embargo, existen ciertas dificultades cuando se quiere expresar una proteína tales como la degradación intracelular por proteasas del hospedero, la incorrecta plegación en el citoplasma, además de que altos niveles de expresión citoplásmica y el incorrecto plegamiento de la proteína recombinante lleva a la formación de cuerpos de inclusión [3].

Otra dificultad en la producción de proteínas recombinantes es su purificación, representando una gran porción del gasto del bioproceso y como consecuencia un incremento en el costo del desarrollo del producto [4].

La producción de proteínas recombinantes altamente puras y en una forma bien caracterizadas se ha convertido en la mayor de las tareas del químico de proteínas. Para esto se han desarrollado péptidos como etiquetas de afinidad, que comparten ciertas características: absorción por purificación en un solo paso, un mínimo efecto en su estructura terciaria, así como en su actividad biológica, fácil y específica remoción para obtener la proteína nativa, ensayos simples y exactos de la proteína recombinante durante su purificación.

Diferentes estrategias han sido desarrolladas para la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Un enfoque es el uso de etiquetas de péptidos pequeños que no deben interferir con la proteína fusionada. Algunos de los más utilizados son la poli-Arg, FLAG, poli-His, entre otras [5].

Las proteínas de fusión son ampliamente utilizadas en bioquímica para facilitar la purificación de la proteína, así como aumentar la solubilidad de la misma [6]. Las proteínas de fusión son péptidos o proteínas muy estables que son genéticamente unidas a alguna proteína de interés para mediar su solubilidad y purificación [7].

Como se mencionó anteriormente, el expresar proteínas en el citoplasma puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión. En algunos casos es deseable ya que la fracción insoluble puede ser recolectada para obtener grandes rendimientos de la proteína. Sin embargo, en otras situaciones esto no es deseable [8].

Un método común para superar este obstáculo es también el uso de proteínas de fusión. En este tipo de estrategia la proteína o el péptido difícil de expresar es fusionado a una o más proteínas para estabilizar la expresión en su forma soluble o insoluble, con la idea de que la proteína de fusión dirigirá el resultado de la expresión. Un cierto número

de proteínas ha sido usado para este propósito, entre ellas la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa (MBP), la Tiorredoxina A (TrxA), el pequeño modificador relacionado a ubiquitina (SUMO), Cetoesteroide isomerasa (KSI) y el Trp Δ LE [9].

Otro aspecto importante en la producción de proteínas es el hospedero en el que se expresan. Los sistemas de expresión bacteriana para la producción de proteínas heterólogas resulta ser atractivo debido a su habilidad para crecer rápidamente y a gran densidad debido al bajo costo de los sustratos, su genética bien caracterizada y la disponibilidad de un gran número de vectores de clonación y cepas huésped mutantes. Para producir grandes niveles de proteína, a menudo es útil clonar el gen corriente abajo de un promotor regulado bien caracterizado.

Esto hace que no sea fácil decidir que hospedero y que sistema promotor es el mejor para la producción de proteínas heterólogas. Muchas de las veces esto depende de la proteína de interés. *Escherichia coli* es una bacteria gram-negativa que es comúnmente utilizada para la producción de proteínas heterólogas [10–12].

La sobreproducción de proteínas recombinantes es acumulada ya sea en el citoplasma o en el periplasma. Frecuentemente el citoplasma es la primera elección para producción de proteínas heterólogas debido a sus grandes rendimientos, sin embargo, una desventaja de sobreproducirlas en este espacio es que una gran cantidad de proteínas forman cuerpos de inclusión. Proteínas con enlaces disulfuro deberían ser acumuladas en el periplasma debido a que favorece el correcto plegamiento. Este proceso oxidativo es catalizado por un grupo de proteínas de unión disulfuro (Dsb). Para que las proteínas recombinantes sean secretadas al periplasma es necesario que se fusione a un péptido líder en la porción N-terminal [10].

En *E. coli*, los enlaces disulfuro se forman en el periplasma, por las proteínas Dsb. Las proteínas DsbA y DsbB se encuentran involucradas en la formación del enlace disulfuro mientras que las proteínas DsbC y DsbD se encuentran relacionadas en la isomerización de los enlaces disulfuro. En la Figura 1 se encuentra un esquema general de estos procesos [13].

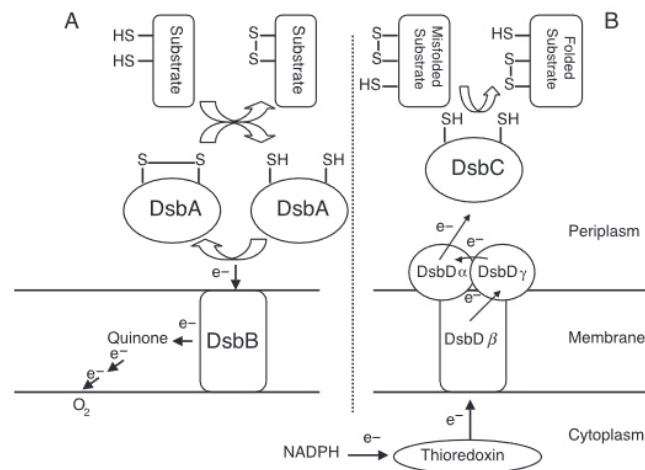


Figura 1. Esquema general de la formación de enlaces disulfuro en el periplasma [13]

Existen dos mecanismos por los que las proteínas son transportadas al periplasma desde el citoplasma: la ruta Sec que puede ser SecB dependiente o SRP dependiente y la ruta Tat. El sistema Sec está involucrado en el transporte de proteínas sin plegar cruzando la membrana citoplásmica y la inserción de proteínas de membrana. El sistema Tat se encuentra implicado en la secreción de proteínas plegadas contiendo o no cofactores [14]. La Figura 2 muestra una representación esquemática de las rutas.

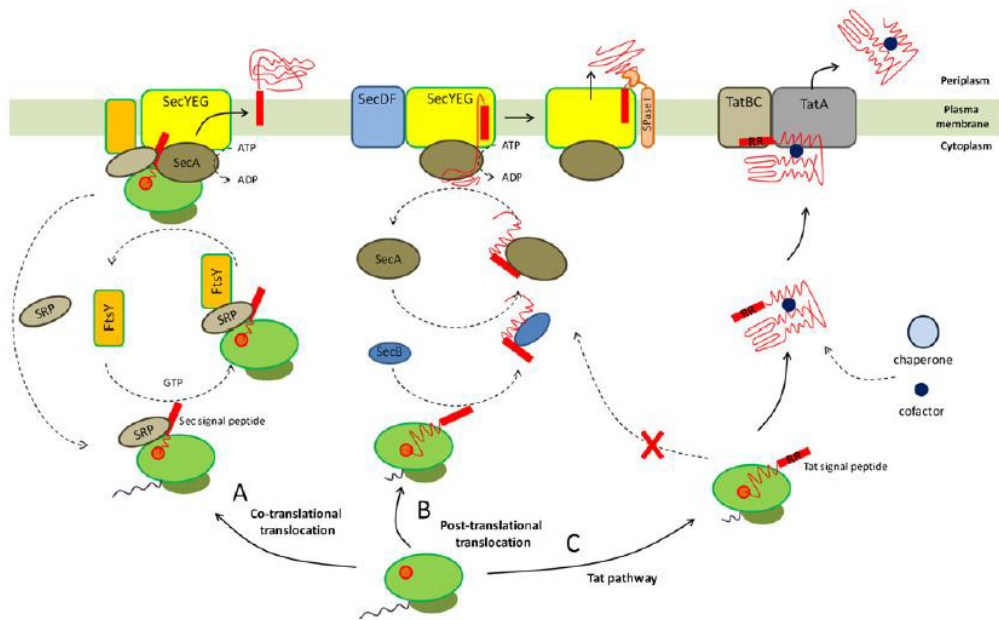


Figura 2. Representación esquemática de la ruta SecB dependiente, SRP dependiente y la ruta Tat [15]

La translocalización Sec es más relevante para la cuestión central de la biología celular. El sistema Sec consiste de componentes proteicos de orientación, un motor proteico y una proteína de membrana integrada a un canal de conducción. Las proteínas secretoras pueden ser orientadas a la Sec-translocasa por dos mecanismos diferentes: el co-transduccional y el post-tranduccional. En este último, la secuencia señal contenida en la proteína secretora es liberada del ribosoma en su estado de síntesis completado y dirigido a la Sec-translocasa.

En varias bacterias gram-negativas las proteínas secretoras son dirigidas a la Sec-translocasa por la secreción del chaperón específico SecB que mantiene estas proteínas en una translocalización competente en un estado no plegado. En el mecanismo co-transduccional, la partícula de reconocimiento de señal (SRP) se une a la secuencia señal de la proteína secretora mientras emerge desde el ribosoma y el complejo ternario de

SRP/ribosoma/cadena de proteína secretora naciente es orientado a la Sec-translocasa [14, 16].

La secuencia señal o péptido señal son un grupo heterogéneo bien caracterizado de péptidos N-terminal escindibles que dirigen la expresión de proteínas a compartimentos celulares específicos. Está formado por 3 regiones: una región hidrofóbica central (h) de 6 a 15 aminoácidos, en su porción C-terminal una región polar y en su porción N-terminal una región polar cargada positivamente. En *E. coli* los péptidos señal de aproximadamente 20 aminoácidos dirigen la secreción de proteínas al periplasma y fuera de la membrana. Los péptidos señal de *E. coli* pueden sustituir de manera satisfactoria los péptidos señal de las proteínas heterólogas para una eficiente expresión [17, 18].

Un gran número de proteínas recombinantes han sido expresadas en el periplasma y en el medio utilizando diferentes péptidos señal de diferentes proteínas en *E. coli* [19]. Es por eso que el péptido señal juega un rol importante en la dirección de las proteínas al periplasma con lo cual se puede realizar alguna modificación o adición de un péptido señal en diferentes proteínas para mejorar la expresión, obtener proteínas mejor plegadas, disminuir la formación de cuerpos de inclusión y que así puedan conservar su actividad.

Como se describió anteriormente, el expresar proteínas recombinantes en el espacio periplásmico utilizando péptidos señal de diferentes proteínas se ha vuelto de gran interés en las últimas décadas para obtener proteínas solubles. Esto ha llevado una búsqueda exhaustiva para encontrar las características óptimas que necesita un buen péptido señal para dirigir de manera satisfactoria las proteínas recombinantes al periplasma de *E. coli*. La elección de un adecuado péptido señal constituye el primer paso

importante en la construcción de un sistema de secreción extracelular de proteínas recombinantes.

Para *E. coli*, el tipo de péptido señal puede ser elegido en base a la disponibilidad comercial o a la preferencia personal. Péptidos señal utilizados previamente en *E. coli* pueden ser empleados como buenos candidatos. Sin embargo, con la limitada disponibilidad de elección en la literatura, podría ser necesario desarrollar péptidos señal más eficientes. Con los avances que ha tenido el proyecto genoma y los sofisticados programas de predicción *in silico*, la identificación de todos los péptidos señal en una célula hospedera pueden ser hechos y evaluados para aumentar la secreción de proteínas recombinantes. Además, con esto se ha logrado no solo predecir el péptido señal de una proteína, sino que también es posible conocer como está compuesto. Un péptido señal está conformado por 3 regiones: la región-n, la región-h y la región-c.

La región-n como su nombre lo indica se encuentra localizada en el extremo N-terminal del péptido señal. Esta región tiene una carga positiva neta las cuales juegan un rol importante en el proceso de translocalización habilitando al péptido señal para insertarse a el mismo dentro de la membrana interna formando un lazo con la cabeza de los lípidos cargados negativamente por interacciones electrostáticas.

Una alta región-n básica puede también promover interacciones con la SRP, influenciando al péptido a que siga la ruta del SecA/SecYEG translocasa. La preferencia por un residuo básico, particularmente lisina en la posición P2 confiere un péptido señal más eficiente. Se ha encontrado que el mejor codón iniciador es AAA que codifica para lisina. Se sugiere que una región-n funcional debería poseer una carga neta de al menos +1 para una eficiente exportación de la proteína recombinante y que diferentes péptidos

señal pueden requerir diferentes magnitudes de cargas positivas para maximizar su eficiencia.

La región-h se le conoce como el centro hidrofóbico y es un rasgo distintivo de un péptido señal funcionando como un paso seguro para el transporte de las proteínas a través del sistema SecA/SecYEG. Por lo tanto, un incremento en la hidrofobicidad en esta región puede mejorar la secreción de proteínas recombinantes. El grado de el efecto de la hidrofobicidad de la región-h en la optimización del péptido señal puede depender de la proteína pasajera. Esto es importante debido a que aumentando la hidrofobicidad del péptido señal natural puede cambiar la ruta blanco de la vía SecB-dependiente a la vía SRP-dependiente.

Además de ser el más hidrofóbico debe contener un residuo de glicina en la parte media del centro hidrofóbico. Sin embargo, la optimización del centro hidrofóbico sustituyendo los residuos menos hidrofóbicos con residuos más hidrofóbicos debería de ser realizado de un residuo a la vez hasta llegar a un balance óptimo entre la secreción de la proteína y el crecimiento celular.

La región-c, conocida como la región de corte, es la región más ambigua para ser optimizada. La regla más destacada es la regla -3,-1 o el estilo AXA con posiciones -1 y -3 que precede al sitio de corte favoreciendo residuos con pequeñas cadenas laterales neutras, en especial alanina. Esta región debe al menos contener cinco residuos de longitud. Los requerimientos para una eficiente región-c son: preferencialmente alanina en la posición -1, en la posición -3 pueden ser alanina, serina, glicina, leucina y cisteína, en la posición -2 se ven favorecidos aminoácidos grandes como tirosina, fenilalanina,

leucina e histidina, en la posición -4 fenilalanina y cisteína pero no lisina ni glicina, en la posición -5 preferentemente de tamaño medio como serina [15].

Debido a los altos costos de producción de proteínas recombinantes se planteará optimizar la proteína de fusión SmbP utilizando péptidos señal alternativos esto con la finalidad de mejorar la expresión en el periplasma. Debido a su pequeño tamaño comparado con otras proteínas de fusión existentes en el mercado, se vuelve de gran interés para mejorar los rendimientos de la expresión de proteínas en el periplasma. Además, se pueden aprovechar sus características de unión a metales para facilitar su purificación y así poder producirlas a bajos costos.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1. SmbP y CusF como proteínas de fusión

SmbP es una proteína monomérica de 4 alfa hélices aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea*, la proteína madura contiene 93 aminoácidos de longitud, contiene un alto número de residuos de histidina y es capaz de unirse a una diferente variedad de metales divalentes y trivalentes, principalmente el cobre II [20]. Esta capacidad de unirse a metales se vuelve de gran interés debido a que pueden ser empleadas como proteínas de fusión para expresar proteínas recombinantes de interés y así facilitar su purificación utilizando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados [21]. SmbP ha sido utilizada como proteína de fusión para la expresión de proteínas heterólogas en el citoplasma y periplasma de *E. coli* [22].

CusF es una proteína que se encuentra en el periplasma de *E. coli* y se encarga de regular las concentraciones de iones metálicos como el cobre (I). Posee una estructura de forma de barril con 5 plegamientos beta la cual le confiere cierta resistencia a la degradación por proteasas [23]. CusF ha sido utilizada como proteína de fusión para la expresión de diversas proteínas heterólogas en el citoplasma y periplasma de *E. coli* [24].

La proteína rojo fluorescente (RFP) fue utilizada como proteína reportera para su expresión periplásmica utilizando las proteínas de fusión SmbP y CusF. Comparando los niveles de expresión en el periplasma de *E. coli* se observó que SmbP producía rendimientos menores que los de CusF [22, 24].

2.2. Expresión de proteínas con diferentes péptidos señal en el periplasma de

E. coli

En 1997 se logró dirigir la proteína ctxB de *Vibrio cholerae* hacia el periplasma por el péptido señal de la enterotoxina lábil al calor (LTIIb) de *E. coli*. En este estudio se logró expresar con 400 μ M de IPTG como inductor con un rendimiento poco considerable en el sobrenadante con respecto a la fase periplásmica obteniendo 42 μ g/ml y 44 μ g/ml respectivamente. Sin embargo al modificar las condiciones de la concentración del inductor reduciéndolo a 20 μ M se logró aumentar las concentraciones de la fase periplásmica con respecto al sobrenadante de manera significativa obteniendo 190 μ g/ml y 69 μ g/ml respectivamente [25].

En 1998 se expresó la proteína de crecimiento similar a la insulina humana en *E. coli* dirigida por el péptido señal de LamB hacia el citoplasma co-expresada con las oxidorreductasas DsbA y DsbC. En este experimento se lograron obtener hasta 8.5 mg/mL de la proteína recombinante en el periplasma [26]. También en 1998 fue posible expresar la proteína estafiloquinasa, una proteína extracelular producida por *Staphylococcus aureus*, en *E. coli* dirigida por el péptido señal de OmpA hacia el espacio periplásmico. En este estudio fue expresada la proteína recombinante en el espacio periplásmico

obteniendo 15 µg/ml de rendimiento contra 40 ng/ml excretados extracelularmente todo esto inducido con 1 mM de IPTG para su expresión [27].

En el 2000 se logró una producción secretora eficiente de la fosfatasa alcalina (PhoA) utilizando el péptido señal de la endoxilanasas de *Bacillus sp.* En este proceso se logró obtener un rendimiento de 5.2 mg/mL de la proteína recombinante en un cultivo de células de gran densidad por lote alimentado inducido con 1 mM de IPTG. Con esto se logró obtener buenos rendimientos de la proteína recombinante en su forma soluble. Además, se utilizó éste péptido señal para expresar la proteína de la leptina humana dentro del periplasma de *E. coli* sin embargo no se muestran resultados o datos acerca de los rendimientos de la misma [28].

En el 2003 fue posible comprobar que el péptido señal de la proteína DsbA unido a la proteína tiorredoxina podía dirigirla eficientemente hacia el espacio periplasmico. En este estudio se utilizó la cepa que expresaba la tiorredoxina tipo-silvestre, una cepa en la cual se le eliminó el gen que codifica a la proteína, una cepa con el plásmido que codifica a la tiorredoxina 1 con el péptido señal de DsbA y una cepa con el plásmido que codifica a la tiorredoxina 1 con el péptido señal de PhoA. Aquí ellos pudieron demostrar que efectivamente el péptido señal de DsbA puede dirigir la tiorredoxina 1 hacia el periplasma casi de manera completa, sin embargo no realizaron una cuantificación de la proporción que era transportada hacia el espacio periplasmico [29].

En el 2010 se expresó el interferón- α 2b en el periplasma de *E. coli* utilizando el péptido señal de PelB. En este estudio se utilizó un medio de cultivo optimizado conteniendo 5.5 g/L de glucosa, 10 mL de glicerol, 55 g/L de extracto de levadura, 42 g/L

de peptona y 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2 mientras que la inducción se llevó a cabo con IPTG a una concentración final de 1 mM [30].

En el 2012 se logró expresar la fosfolipasa A2 de *Streptomyces violaceoruber* en *E. coli* dirigida por el péptido señal de PelB hacia el espacio periplásmico optimizando los codones de esta a los más comunes en *E. coli*. En este estudio no se reportan rendimientos de la proteína sin embargo pueden concluir que al remover el péptido señal PelB lograron ver que la proteína se quedaba concentrada en el citoplasma. Esto sugiere que el péptido señal dirige primero la proteína recombinante desde el citoplasma hacia el periplasma atravesando la membrana interna siguiendo un mecanismo péptido señal dependiente y posteriormente por un mecanismo desconocido es transportada hacia la fracción sobrenadante [31].

En el 2013 se expresó el dominio simple 3 del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2 D3) en *E. coli* utilizando el péptido señal de PelB para guiar la expresión al periplasma. En este estudio se optimizó la expresión del VEGFR2 D3 obteniendo rendimientos de 1.989 mg/L variando las concentraciones de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno inorgánico, la fuente de nitrógeno orgánico y la concentración de NaCl. Además, se consideran otros factores como la temperatura de inducción, la velocidad de agitación, el tiempo de inducción y la concentración del inductor [32].

En el 2014 fue posible expresar la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* en *E. coli* dirigida por el péptido señal de DsbA, FhuD y MalE hacia el periplasma optimizando los codones de estos a los más comunes utilizados por *E. coli*. No se reportan datos sobre las concentraciones obtenidas de la proteína recombinantes,

sin embargo, se puede observar en los geles SDS-PAGE reportados que en la fracción periplásmica existe una gran presencia y en la fracción del sobrenadante prácticamente es nula. Con esto concluyen que es necesario poder realizar diferentes combinaciones de péptidos señal para encontrar el que sea óptimo para mejorar la expresión de proteínas recombinantes que sean dirigidas hacia el periplasma [33]. Así mismo, en ese mismo año se expresó *E. coli* una xilanasa termoestable del hongo termofílico *Thermomyces lanuginosus* utilizando la proteína de fusión OsmY la cual contenía su péptido señal para ser dirigida al periplasma [34].

En el 2015 se logró expresar la κ I O8/O18 germinal de la cadena ligera del anticuerpo de dominio variable (V_L) utilizando el péptido señal de la proteína Amicyanin, una proteína de cobre tipo I del periplasma de *Paracoccus denitrificans* codificada por el gen MauC a la cual se le optimizaron los codones por los más comunes utilizados por *E. coli* y fue dirigida hacia el espacio periplásmico de *E. coli*. En este estudio se lograron obtener hasta 70mg/L de κ I O8/O18 V_L en el periplasma de la cual pudo ser purificada fácilmente sin la evidencia de la formación de agregados o cuerpos de inclusión [35].

2.3. Predicción del péptido señal y las regiones n, h, c.

El grado de conservación y longitud de un péptido señal así como la posición de corte varían significativamente entre diferentes proteínas, especialmente si se trata de células eucariotas o bacterias. Existen numerosas herramientas en la web que facilitan a los genómicos y proteómicos la predicción de un péptido señal esto con la finalidad de utilizarlo en la expresión de proteínas o analizar la composición de sus regiones. Entre las herramientas encontradas en la web se encuentra SignalP, PrediSi y Phobius son muy

buenas opciones como herramientas en la predicción de péptidos señal ya que procesa secuencias de proteínas de manera eficaz en periodos de tiempo cortos [15, 36, 37].

Una vez que es identificado el sitio de corte del péptido señal así como su tamaño y secuencia, es de interés conocer la composición de cada región del péptido señal. Existen ciertas reglas que son de gran utilidad para poder predecir las regiones n,h y c.

Primero, debemos ubicarnos en la posición -1 del péptido señal, aquí comenzaremos a asignar la región-c, se escaneara corriente arriba hacia la N-terminal, avanzaremos tres posiciones corriente arriba asignando desde el -1 al -3 como la región-c mínima. Segundo, para asignar la región-h se comenzará a avanzar corriente arriba a partir de la posición -3 hasta encontrar dos residuos hidrofóbicos consecutivos (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp o Val). Tercero, se avanzará seis posiciones corriente arriba y se procederá a asignar la región-n al encontrar un residuo cargado positivamente o al menos tres residuos no hidrofóbicos de manera consecutiva. Cuarto, si el final del extremo N-terminal de la región-h no es un residuo hidrofóbico, se tendrá que avanzar corriente abajo hasta encontrar al menos un residuo hidrofóbico para poder asignar ahora si la región-h y la región-n.

Esta última regla nos indica que en la región-h debe haber al menos un residuo hidrofóbico en el extremo N-terminal y dos residuos hidrofóbicos consecutivos en el extremo C-terminal [37, 38].

2.4. Choque osmótico para la extracción de proteínas periplásmicas

Desde hace décadas se han reportado diversos métodos para la extracción de proteínas del periplasma de *E. coli*.

En 1965, Neu y Heppel reportan un método para la liberación de proteínas del periplasma de *E. coli*. En este método utilizan una solución que contiene 20% de sacarosa, 0.03 M de Tris-HCl pH 8.0 y 1×10^{-3} M de EDTA con la cual se resuspende el sedimento celular y se incuba durante 10 minutos en agitación. Posteriormente mediante centrifugación se recolecta el sobrenadante y el sedimento celular es resuspendido rápidamente en agua fría y se incuba durante 10 minutos en hielo con agitación. Finalmente recolectan el sobrenadante el cual es designado como fracción periplásmica. Con este método ellos lograron liberar ciertas enzimas, entre ellas se encuentra la fosfatasa alcalina, la fosfodiesterasa cíclica, la β -galactosidasa, la RNasa, por mencionar algunas [39].

En 1996, French et al. desarrollan un método simple para la liberación de proteínas del periplasma de *E. coli*. Este método es una modificación del desarrollado por Neu y Heppel [39] y Witholt et al. [40] para la extracción de la α -amilasa, en el cual el sedimento celular es resuspendido en una solución conteniendo 20% de sacarosa y diferentes concentraciones de lisozima, Tris-HCl pH 7.5 y EDTA para posteriormente ser incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos y recuperar el sobrenadante por centrifugación el cual es designado como fracción periplásmica. Así mismo, el sedimento celular es lavado con agua a 4 °C y el sobrenadante es recuperado por centrifugación el cual es designado como fracción de lavado con agua fría [41].

En 1997, Pierce et al. desarrollan un método para la extracción de proteínas del periplasma de *E. coli* utilizando lisozima. Este método es una modificación del desarrollado por French et al. [41] para la extracción de la α -amilasa, en el cual el sedimento celular es resuspendido en una solución que contiene 20% de sacarosa, 0.5

mg/mL de lisozima y 1 mM de EDTA. Se incubaba de manera estática a temperatura ambiente durante 10 minutos para posteriormente adicionar agua en la misma cantidad que se adicionó la solución inicial. Se incubaba nuevamente de manera estática a temperatura ambiente durante 10 minutos y se recolecta el sobrenadante por centrifugación denominándolo fracción periplásmica [42].

En el 2010, Ramanan et al. realizan la optimización del choque osmótico para la extracción del interferón- $\alpha 2b$ del periplasma de *E. coli* utilizando el método de superficie respuesta. En este método ellos proponen que las células se deben resuspender a una concentración celular de 0.05 g/mL con la solución hipertónica incubando por 10 minutos, centrifugar para obtener el sedimento celular para resuspenderlo en agua a una concentración celular de 0.2 g/mL incubando por 10 minutos y obtener el sobrenadante por centrifugación conteniendo las proteínas periplásmicas. Además, la solución hipertónica fue optimizada conteniendo 18% de sacarosa, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 2.5 mM EDTA [30].

En el 2013, Cao et al. describen un método para la extracción del factor VEGFR2 D3 del periplasma de *E. coli* utilizando una solución hipertónica conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 18% Sacarosa y 0.1 mM de EDTA con la cual se resuspende el sedimento celular y se incubaba durante 10 minutos. Posteriormente se recolecta el sobrenadante hipertónico por centrifugación y el sedimento celular se resuspende en solución hipotónica conteniendo 5 mM de $MgSO_4$ y se incubaba durante 10 minutos. El sobrenadante hipotónico se recolecta y se junta con el sobrenadante hipertónico y se designa como fracción periplásmica [32].

En el 2014, Le et al. utilizan el método de choque osmótico reportado por Thorstenson et al. con algunas modificaciones para la extracción de una xilanasa termoestable, del hongo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, del periplasma de *E. coli*. En este método se resuspende el sedimento celular en una solución hipertónica conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% de sacarosa y 1 mM de EDTA. Posteriormente se recolecta el sobrenadante hipertónico por centrifugación y el sedimento celular se resuspende en agua fría y se incuba durante 10 minutos para finalmente agregar MgCl_2 a una concentración final de 1 mM e incubar durante 10 minutos en hielo. El sobrenadante es recolectado por centrifugación y se designa como fracción periplásmica [34].

CAPÍTULO 3

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de péptidos señales alternativos como PelB y CusF en SmbP cuantificando la expresión de proteínas en el periplasma de *E. coli*.

3.2. Objetivos específicos

- Construir vectores de expresión modificando la secuencia señal de SmbP que contengan la secuencia de RFP como proteína reportera.
- Expresar, purificar y cuantificar las diferentes versiones de SmbP-RFP.
- Comparar los niveles de producción de RFP marcado con las diferentes versiones de SmbP.

3.3. Hipótesis

Intercambiando la secuencia señal de SmbP por la de CusF o PelB se obtendrán mejores rendimientos en la expresión de proteínas recombinantes en el periplasma de *E. coli* marcadas con la proteína de fusión SmbP.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP

Se diseñaron los insertos del gen SmbP con el péptido señal de CusF y PelB utilizando la herramienta SignalP 4.1 la cual facilitó la predicción del péptido señal de CusF, PelB y SmbP. La secuencia de aminoácidos del péptido señal de SmbP fue sustituida por la de CusF y PelB para obtener el diseño final de los insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP.

Los insertos fueron enviados a sintetizar a GenScript, Corporation con los codones optimizados a los más utilizados por *E. coli*. Los insertos venían contenidos en el plásmido pUC57 conteniendo el gen de resistencia a la ampicilina.

4.2. Amplificación de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p

Para la amplificación se utilizaron 2 iniciadores delanteros diferentes, uno para la amplificación de CusFps-SmbP y CusF3H+p y el otro para la amplificación de PelBps-SmbP. Para el iniciador reverso también se utilizaron 2 diferentes, uno para la

amplificación de CusFps-SmbP y PelBps-SmbP y otro para la amplificación de CusF3H+p (ver Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+

Iniciador	Secuencia de aminoácidos
CusFps-SmbP y CusF3H+ iniciador delantero	5'-ATGCAGTCACATATGAAAAAAGCACTGCAAGTCG-3'
PelBps-SmbP iniciador delantero	5'-ATGCATGCACATATGAAATACCTGCTGCCG-3'
CusFps-SmbP y PelBps-SmbP iniciador reverso	5'-ATGCATGGATCCGTGCGATTTATGTTCCGGATGC-3'
CusF3H+ iniciador Reverso	5'-ATGCATGCAGGTACCCTGGCTGACTTTAATATCCTGTAA-3'

Los iniciadores delanteros se diseñaron conteniendo el sitio de corte para la enzima de restricción NdeI, mientras que los iniciadores reversos contenían el sitio de corte de la enzima KpnI.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL en microtubos para PCR de 200 µL. La reacción contenía los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN de los insertos (CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+), 5 µL de solución amortiguadora de reacción, 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10nM) de dNTPs, 1 µL de *Vent* polimerasa y se completó la reacción con 36 µL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 1 minuto a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones y se purificaron utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION de Qiagen.

4.3. Construcción de plásmidos

4.3.1. Construcción del plásmido pET30a-Ent

Se realizó la construcción del plásmido pET30 que contuviera el gen de la enteroquinasa el cual fue sintetizado por GenScrip Corporation.

4.3.1.1. Digestión del gen de la enteroquinasa y el plásmido pET30a

La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y XhoI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a, la reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 11.2 μ L (1.5 μ g) de ADN plasmídico (pET30a), 2 μ L de solución amortiguadora CutSmart 10x (NEB), 4.8 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μ L de la enzima NdeI y 1 μ L de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μ L de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

Como el gen de la enteroquinasa venía insertado en el plásmido pUC57 se procedió a realizar una digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI debido a que el gen contiene los sitios de reconocimiento de estas enzimas. La digestión del inserto de la enteroquinasa se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L y consistió de los siguientes reactivos: 5.6 μ L (3 μ g) del plásmido pUC57-Ent, 2 μ L de solución amortiguadora CutSmart 10x (NEB), 10.4 μ L de agua mQ, 1 μ L de la enzima NdeI (NEB) y 1 μ L de la

enzima XhoI (NEB), se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.3.1.2. Ligación del plásmido pET30a e inserto de la enteroquinasa

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL y consistió de los siguientes reactivos: 3 µL de pET30 previamente digerido, 5.5 µL de inserto (Enteroquinasa), 1 µL de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic) y 0.5 µL de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 µL de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 5.5 µL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante (BioBasic).

4.3.1.3. Transformación de pET30a-Ent en *E. coli* DH5α

Una vez inactivada la T4 DNA ligasa se procedió a realizar la transformación con la reacción de ligación en *E. coli* DH5α utilizando el protocolo que se describe en el punto 4.3.1.3.

4.3.1.4. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el protocolo descrito en el punto 4.3.1.4 empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.3.1.5. Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico obtenido de las colonias seleccionadas se procedió a realizar un análisis confirmatorio para ratificar la presencia del plásmido pET30a-Ent. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y

reversos T7. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30-Ent), 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μ L (10nM) de dNTPs, 0.5 μ L de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 55 °C y elongación por 1 minuto y 15 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.3.2. Construcción de pET30a-CusFps-SmbP-RFP, pET30a-PelBps-SmbP-RFP y pET30a-CusF3H+p-RFP

Se emplearon técnicas convencionales de clonación (digestión, ligación y transformación) para la construcción de estos plásmidos.

4.3.2.1. Digestión del plásmido pET30a-CusFp-RFP e insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p

Se realizó la digestión de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP, CusF3H+ y el plásmido pET30a-CusFp-RFP. Cabe destacar que ya se contaba con este plásmido que contiene el gen de RFP al cual mediante la digestión se le sustrajo CusFp. La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y KpnI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a-CusFp-RFP, la reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L y consistió de los siguientes reactivos: 13

μL (1.5 μg) del plásmido pET30a-CusFp-RFP, 2 μL de solución amortiguadora 1.1 10x (New England Biolabs, NEB) y 2 μL de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μL de la enzima NdeI (NEB) y 1 μL de la enzima KpnI (NEB), se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μL de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

La digestión de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+ se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL y consistió de los siguientes reactivos: 28 μL (1.5 μg) del inserto obtenido de la amplificación y que posteriormente fue purificado, 5 μL de solución amortiguadora 1.1 10x (NEB), 15 μL de agua mQ, 1 μL de la enzima NdeI (NEB) y 1 μL de la enzima KpnI (NEB), se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.3.2.2. Ligación del plásmido pET30a-RFP e insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL y consistió de los siguientes reactivos: 3 μL de pET30-RFP previamente digerido, 1 μL de inserto (CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+), 2 μL de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 13.5 μL de agua mQ y 0.5 μL de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μL de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 14.5 μL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante (BioBasic).

4.3.2.3. Transformación de pET30a-CusFps-SmbP-RFP, pET30a-PelBps-SmbP—RFP y pET30a-CusF3h+-RFP en *E. coli* DH5α

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* DH5α la cual es especial para la propagación de ADN plasmídico. Se emplearon 5 µL del producto de ligación inactivado previamente en 30 µL de células de *E. coli* DH5α rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente se procedió a realizar el choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 µg/mL) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.3.2.4. Extracción de ADN plasmídico

Basado en las colonias obtenidas en las placas con producto de reacción de ligación y en el control negativo, se realizó la selección de varias colonias. Estas, fueron inoculadas en 6 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Mediante centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos se recolectó el sedimento celular de los 6 mL del cultivo, una vez obtenidas las células se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.3.2.5. Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico obtenido de las colonias seleccionadas se procedió a realizar un análisis confirmatorio para ratificar la presencia del plásmido. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y reversos previamente descritos para la amplificación de los insertos. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30-CusFps-SmbP-RFP, pET30a-PelBps-SmbP-RFP y pET30a-CusF3H+-RFP), 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μ L (10nM) de dNTPs, 0.5 μ L de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 1 minuto y 15 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.3.3. Construcción del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-rhGM-CSF

Se procedió a realizar la construcción del plásmido pET30-PelBps-SmbP-rhGM-CSF utilizando técnicas convencionales de clonación.

4.3.3.1. Digestión del gen rhGM-CSF y el plásmido pET30a-PelBps-SmbP

La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NcoI (New England Biolabs, NEB) y XhoI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido

pET30a-PelBps-SmbP, la reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 11.2 μ L (1.5 ng) de ADN plasmídico (pET30a-PelBps-SmbP), 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 4.8 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μ L de la enzima NdeI y 1 μ L de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μ L de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

Como el gen rhGM-CSF venía contenido en el plásmido pUC57 se procedió a realizar una digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI debido a que el gen contiene los sitios de reconocimiento de estas enzimas. La digestión del inserto rhGM-CSF se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L y consistió de los siguientes reactivos: 10.5 μ L (5 μ g) del plásmido pUC57-rhGM-CSF, 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 4.5 μ L de agua mQ, 1.5 μ L de la enzima NdeI (NEB) y 1.5 μ L de la enzima XhoI (NEB), se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.3.3.2. Ligación del plásmido pET30a-PelBps-SmbP e inserto rhGM-CSF

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L y consistió de los siguientes reactivos: 3 μ L de pET30-PelBps-SmbP previamente digerido, 5.5 μ L de inserto (rhGM-CSF), 1 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic) y 0.5 μ L de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μ L de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen

final con 5.5 µL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante.

4.3.3.3. Transformación de pET30a-PelBps-SmbP-rhGM-CSF en *E. coli* DH5α

Una vez inactivada la T4 DNA ligasa se procedió a realizar la transformación con la reacción de ligación en *E. coli* DH5α utilizando el protocolo que se describe en el punto 4.3.1.3.

4.3.3.4. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el protocolo descrito en el punto 4.3.1.4 empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.3.3.5. Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico pET30a-PelBps-SmbP-rhGM-CSF obtenido de las colonias seleccionadas se procedió a realizar un análisis confirmatorio para ratificar su presencia. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y reversos T7. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30-PelBps-SmbP-rhGM-CSF), 5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10 nM) de dNTPs, 0.5 µL de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 µL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 55 °C y elongación por 1 minuto y 15 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis

en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.4. Expresión de proteínas

Se describe a continuación el protocolo utilizado para la expresión de proteínas de las diferentes construcciones realizadas.

4.4.1. Transformación de *E. coli* BL21(DE3)

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual es especial para la expresión de proteínas, utilizando las diferentes construcciones realizadas. Se empleó 1 µL del ADN plasmídico a probar en 20 µL de células de *E. coli* BL21(DE3) rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente realizó el choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 mg/mL) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.4.2. Expresión piloto de proteínas

Se llevó a cabo una expresión piloto de proteínas de las colonias que se obtuvieron de la transformación de las construcciones en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con la finalidad de observar la expresión de la proteína deseada. Se realiza la selección de varias

colonias y utilizando un aplicador se transfiere una colonia en un tubo conteniendo 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 µg/mL). Se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Alcanzada esta D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas. Posterior a la incubación se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 10000 rpm durante 2 minutos.

4.4.3. Obtención de la fracción soluble e insoluble

Para obtener la fracción soluble a partir del sedimento celular se resuspende el sedimento en 120 µL de agua mQ, después se agregan 40 µL de solución amortiguadora de carga para SDS-PAGE 6x y se mezcla suavemente, se hierve durante 10 minutos y se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos. Se separa el sobrenadante como fracción soluble, al sedimento restante se le agregan 120 µL de solución de urea 8 M y se hierve de nuevo durante otros 10 minutos de esta manera los cuerpos de inclusión se solubilizan en la solución de urea, finalmente se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos obteniendo así la fracción insoluble en el sobrenadante el cual es posteriormente visualizado mediante el SDS-PAGE al igual que la fracción soluble.

4.4.4. Análisis de las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE

Una vez obtenidas las fracciones se procede a realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12% y un gel apilador al 4%. Una vez terminada la electroforesis se realiza la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.4.5. Expresión piloto para la extracción de proteínas periplásmicas

Se llevó a cabo una expresión piloto de proteínas de las colonias que se obtuvieron de la transformación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con la finalidad de observar la expresión de la proteína periplásmica deseada. Se hizo la selección de las colonias que presentaron la mejor expresión y se sembraron en un tubo conteniendo 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30mg/mL) incubándose a 37 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas para obtener el inóculo correspondiente. A 30 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 mg/mL) se le inocularon 30 µL del inóculo previamente preparado y se incubó a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas.

4.4.6. Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico

Para la extracción de proteínas periplásmicas se siguió el método lisozima/choque osmótico con modificaciones. De la expresión piloto realizada en el punto 4.4.5, se tomaron los 30 mL del cultivo y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a 4 °C para obtener los sedimentos celulares a los cuales se les tomó el peso húmedo. Después se resuspendieron los sedimentos a una concentración celular de 0.04 g/mL en solución hipertónica conteniendo 200 mM de Tris-HCl, 20 % de sacarosa, 2 mM de EDTA y 0.5 mg/mL de lisozima. Se incubaron a 4 °C durante 45 minutos, se centrifugaron nuevamente los sedimentos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como

fracción hipertónica. Posteriormente, se resuspendieron los sedimentos celulares a una concentración de 0.04 g/mL en solución hipotónica que contenía solo agua mQ. Se incubaron a 4 °C durante 45 minutos, se centrifugaron nuevamente los sedimentos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como fracción hipotónica. Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE como en el punto 4.4.4.

4.4.7. Escalamiento de la expresión a 1 L

Se realizó un escalamiento de la expresión de PelBps-SmbP-RFP. Se hizo la selección de las colonias que presentaron la mejor expresión. Para esto las expresiones se llevaron a cabo en matraces de 500 mL obteniendo un volumen final de 1 L. Los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente preparado de la colonia seleccionada y se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas. Los sedimentos celulares se recolectaron en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 10000 rpm y se procedió a realizar la extracción de proteínas periplásmicas utilizando el método de lisozima/choque osmótico como en el punto 4.4.6.

4.5. Microscopía de fluorescencia

Se realizó el análisis por microscopía de fluorescencia de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+-RFP y SmbPp-RFP. Se utilizó un microscopio marca Leica (modelo DM3000) con lámpara de mercurio y filtro Texas Red con un rango de longitud de onda de excitación de 542-576 nm y emisión de 596-664 nm. Primero se realizó una

expresión piloto como en el punto 4.4.5. Se tomaron 2 mL del cultivo expresado y se recolectó el sedimento celular por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos. Se resuspendió el sedimento con 2 mL de agua mQ, se tomó una alícuota de 10 μ L colocándola en un portaobjetos. Las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos y fueron observadas con el objetivo de inmersión 100x.

4.6. Purificación de proteínas

Se describirá a continuación la metodología empleada para la purificación de las fracciones periplásmicas.

4.6.1. Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus

Se utilizó una columna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) la cual fue cargado con iones níquel previamente. La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de solución amortiguadora de equilibrio que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8.0 utilizando un flujo de 1.0 mL/min y una presión máxima de seguridad de 0.5 MPa según recomienda el fabricante. Se tomaron 50 mL de la fracción hipotónica y se diluyeron con solución amortiguadora de lavado que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0. Una vez diluida, se cargó en la columna utilizando un flujo de 0.5 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando la fase no unida. Posterior a esto la columna se lavó con la misma solución amortiguadora con la que se diluyó la muestra hasta que la señal U.V. descendiera y se mantuviera constante. Finalmente se llevó a cabo la elución en un solo paso utilizando una solución amortiguadora de elución que contenía 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl y 200 mM imidazole pH 8.0. El flujo fue mantenido a 0.5 mL/min y una presión

máxima de 0.5 MPa recolectando fracciones de 0.5 mL las cuales fueron conservadas para su posterior análisis mediante SDS-PAGE como en el punto 4.4.4.

4.6.2. Diálisis para la remoción de imidazol

De las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con el sistema ÄKTA prime plus, se seleccionaron las que mostraron una cantidad considerable de la proteína RFP, tanto por SDS-PAGE como visualmente por coloración. Estas fracciones fueron colectadas en una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y fue dializado para retirar el exceso de imidazol utilizando una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0. Se realizaron 2 diálisis de una hora cada una y una de 16 horas. Una vez que la muestra fue dializada, se conservó en congelación a -20 °C.

4.7. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones del estándar de BSA (1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL). En una placa de 96 pocillos se adicionaron 5 µL, tanto del estándar como de las muestras a analizar, en diferentes pocillos. Posteriormente se adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos con agitación en un lector de microplacas marca Thermo Scientific (Modelo MultiSkan GO) para finalmente realizar la medición de la absorbancia a 595 nm en el mismo lector. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.8. Remoción de la proteína de fusión

Para la remoción de la proteína de fusión se realizó mediante la enzima enteroquinasa de cadena ligera (NEB). Se tomó 1 mg de proteína dializada previamente y

se le adicionaron 3 μ L de la respectiva enzima. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 16 horas y posterior a esto se realizó una purificación utilizando la resina ProfinityTM IMAC la cual fue cargada previamente con iones níquel siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). La muestra fue incubada en la resina durante 1 hora y se procedió a recolectar la muestra conteniendo la proteína de interés. Posteriormente se realizaron 3 lavados a la resina utilizando solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1 para finalmente realizar la elución utilizando solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. Se realizó la visualización por SDS-PAGE empleando un gel de resolución al 15% y un apilador al 4%. El gel se reveló utilizando una tinción de Coomassie.

4.9. Cuantificación de RFP por fluorescencia

Para la cuantificación de RFP de las diferentes expresiones se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de RFP (70000 ng/mL, 50000 ng/mL, 20000 ng/mL, 10000 ng/mL, 5000 ng/mL, 2500 ng/mL y 1000 ng/mL). Las diluciones de las diferentes concentraciones se realizaron con solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0. Posteriormente se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro de fluorescencia marca PerkinElmer (modelo LS 55) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1. Diseño de insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP

Se obtuvieron los péptidos señal de las proteínas CusF, PelB y SmbP mediante la herramienta SignalP 4.1. El péptido señal de CusF y PelB es de 22 aminoácidos, mientras que el de SmbP es de 24 aminoácidos (ver Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos del péptido señal de las proteínas SmbP, CusF y PelB.

Péptido señal	Origen	Secuencia de aminoácidos
SmbP	<i>Nitrosomonas europaea</i>	MKTTLIKVIAASVTALFLMQVYA
CusF	<i>E. coli (strain K12)</i>	MKKALQVAMFSLFTVIGFNAQA
PelB	<i>Erwinia carotovora</i>	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

La secuencia del péptido señal de la proteína SmbP fue sustraída y en su lugar se insertó la de las proteínas de CusF y PelB para así obtener las proteínas CusFps-SmbP y PelBps-SmbP (ver Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de los insertos CusFps-SmbP y PelBps-SmbP.

Inserto	Secuencia de aminoácidos
CusFps-SmbP	MKKALQVAMFSLFTVIGFNAQASGHTAHVDEAVKHAEAEVAHGK EGHTDQLLEHAKESLTHAKAASEAGGNTHVGHGIIKHLEDAIKHGEEG HVG VATKHAQEAIEHLRASEHKSH
PelBps-SmbP	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMASGHTAHVDEAVKHAEAEVAHGK EGHTDQLLEHAKESLTHAKAASEAGGNTHVGHGIIKHLEDAIKHGEEG HVG VATKHAQEAIEHLRASEHKSH

5.2. Amplificación de los insertos CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p que estaban contenidos en el plásmido pUC57 mostrando un producto de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de aproximadamente 348 pb para CusF3H+ y 354 pb para CusFps-SmbP y PelBps-SmbP. Los productos de amplificación de CusF3H+p y PelBps-SmbP se pueden apreciar en la Figura 3 y el de CusFps-SmbP en la Figura 4.

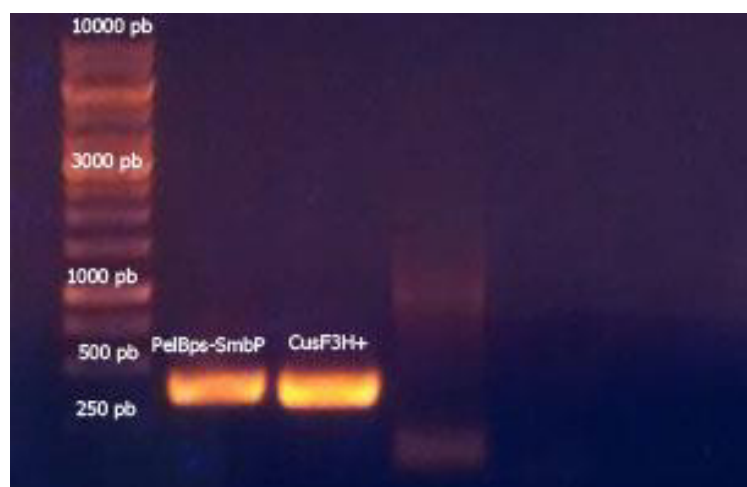


Figura 3. Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el gen de la proteína CusF3H+p y PelBps-SmbP contenidos en el plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

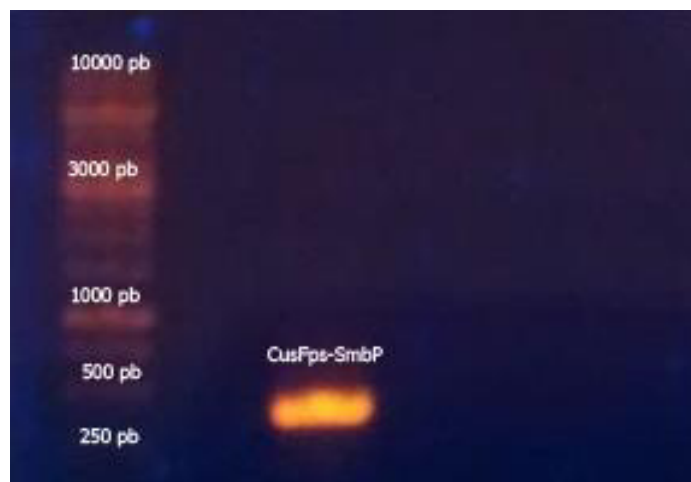


Figura 4. Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el gen de la proteína CusFps-SmbP contenido en el plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

5.3. Clonación molecular de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p

Una vez realizadas las reacciones de digestión de los productos de amplificación CusFps-SmbP, PelBps-SmbP, CusF3H+p y del plásmido pET30 el cual contenía el gen de RFP, se sometieron a la reacción de ligación. El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes. En el caso de la construcción de CusFps-SmbP-RFP, se seleccionaron solo dos colonias transformantes debido a que fueron las únicas que crecieron.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron como iniciadores delanteros los específicos para CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p, como iniciador reverso se utilizó el específico para RFP. Para CusF3H+p-RFP, CusFps-SmbP y PelBps-SmbP se obtuvo una banda ligeramente encima de las 1000 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 5. El carril 1 de la colonia CusFps-SmbP-RFP y el

carril 8 de la colonia CusF3H+p-RFP no se tomaron en cuenta debido a que la amplificación resulto negativa para esas construcciones.

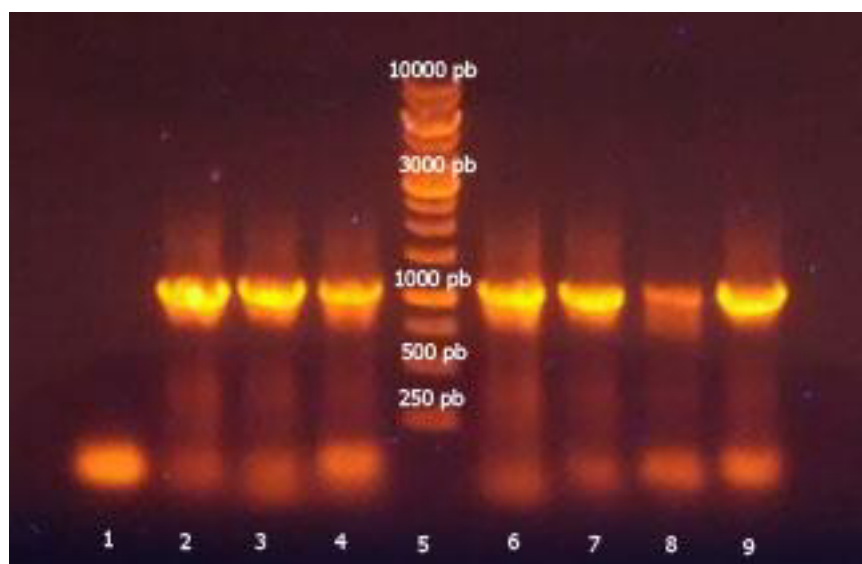


Figura 5. PCR de confirmación de las construcciones realizadas. En el carril 5 se muestra el marcador GeneRuler 1kb DNA ladder. En el carril 1 y 2 se muestra la amplificación de las colonias de CusFps-SmbP-RFP. En el carril 3,4 y 6 se muestra la amplificación de las colonias de PelBps-SmbP-RFP. En el carril 7-9 se muestra la amplificación de las colonias de CusF3H+p-RFP.

5.4. Clonación molecular del gen de la enteroquinasa

A partir del plásmido pUC57, el cuál contenía el gen de la enteroquinasa, se realizó una digestión para extraer el gen del plásmido. Se corrió un gel de agarosa al 0.7% y posteriormente se realizó el corte en el gel de la banda que aparecía aproximadamente a 800 pb correspondiente al gen de la enteroquinasa (ver Figura 6).

Una vez realizadas las reacciones de digestión del gen de la enteroquinasa y del vector pET30, se sometieron a la reacción de ligación. El producto de ligación se

transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

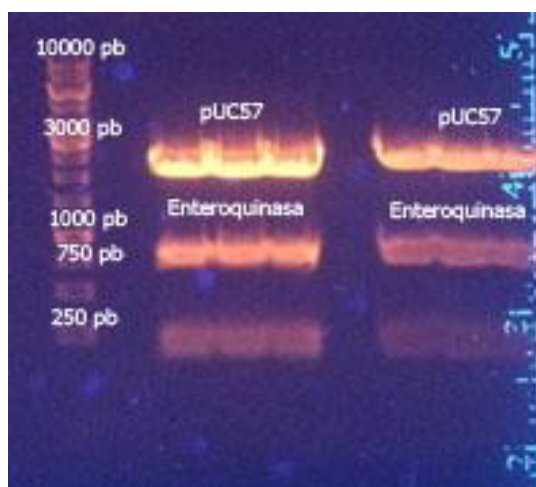


Figura 6. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión del gen de la enteroquinasa contenido en el plásmido pUC57. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. En el gel de agarosa al 0.7% se aprecia una banda aproximadamente a 1000 pb del marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder. El uso de los iniciadores T7 aumenta el tamaño de la banda amplificada como se muestra en la Figura 7.

5.5. Clonación molecular del gen rhGM-CSF

A partir del plásmido pUC57, el cuál contenía el gen de la enteroquinasa, se realizó una digestión para extraer el gen del plásmido. Se corrió un gel de agarosa al 0.7% y posteriormente se realizó el corte en el gel de la banda que aparecía aproximadamente a 500 pb correspondiente al gen rhGM-CSF.

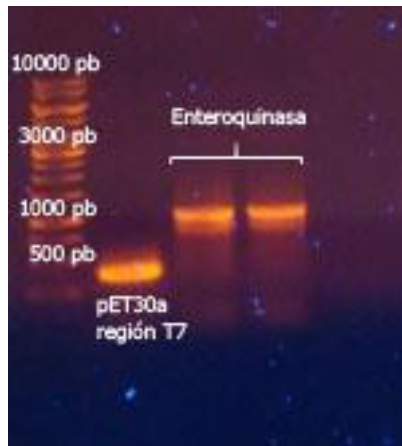


Figura 7. Gel de agarosa al 0.7% del PCR de confirmación del gen de la enteroquinasa en el vector pET30a. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

Una vez realizadas las reacciones de digestión del gen rhGM-CSF2 y del vector pET30, se sometieron a la reacción de ligación. El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. En el gel de agarosa al 0.7% se aprecia una banda ligeramente por debajo de las 1000 pb del marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder. El uso de los iniciadores T7 aumenta el tamaño de la banda amplificada como se muestra en la Figura 8.

5.6. Expresión piloto de proteínas recombinantes y análisis por SDS-PAGE de

CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+-RFP y SmbPp-RFP

Una vez transformadas las construcciones en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión de las proteínas de interés. De manera visual se percibió que los pellets se tornaron de color rojo siendo PelBps-SmbP-

RFP el más rojo seguido de CusF3H+p-RFP, después CusFps-SmbP-RFP y finalmente SmbPp-RFP. En la Figura 9 se aprecian los pellets de las 3 proteínas.

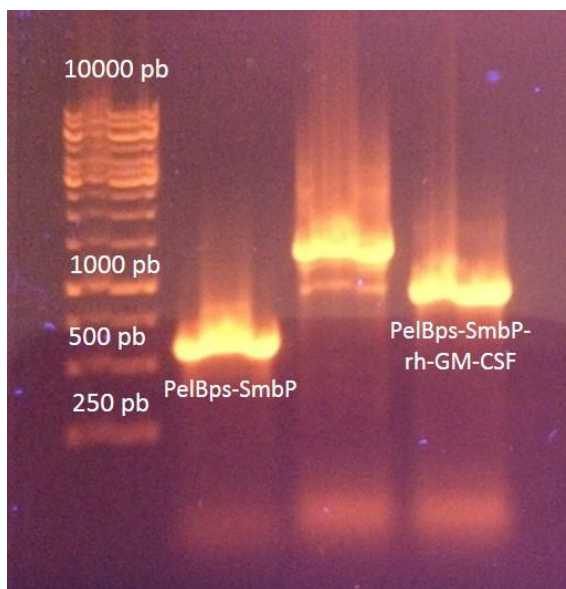


Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% del PCR de confirmación del gen rhGM-CSF en el plásmido pET30a-PelBps-SmbP. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder.

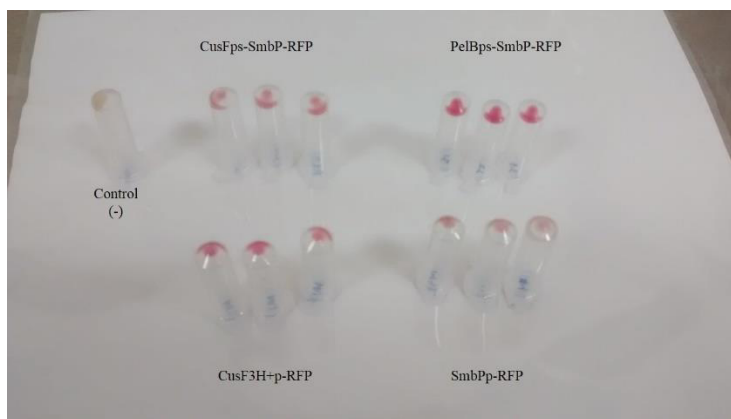


Figura 9. Pellets de la expresión piloto de proteínas en *E. coli* BL21(DE3) a 25 °C durante 16 horas.

Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para las 3 proteínas es de aproximadamente 40 KDa las cuales se observan en la Figura 10 y 11.

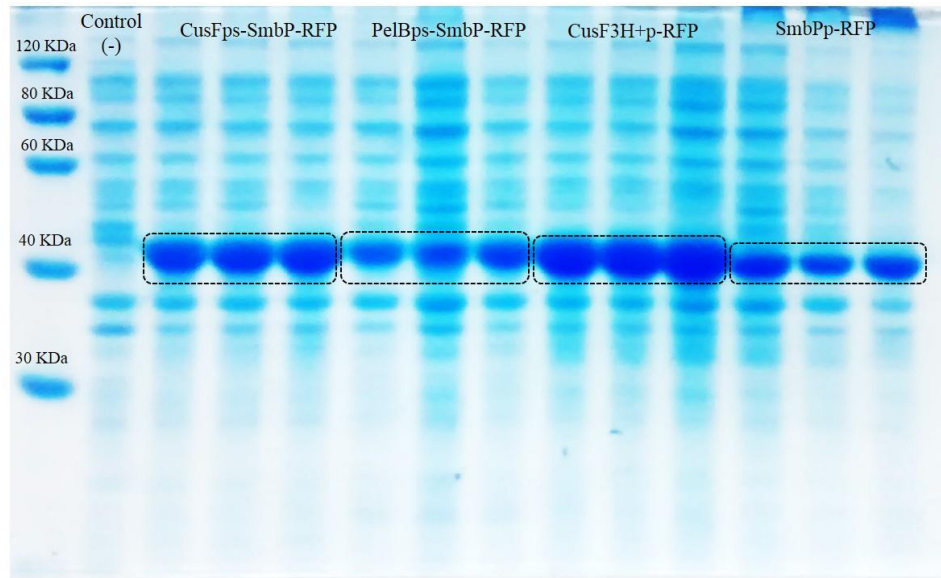


Figura 10. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de proteínas. Fracción soluble de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

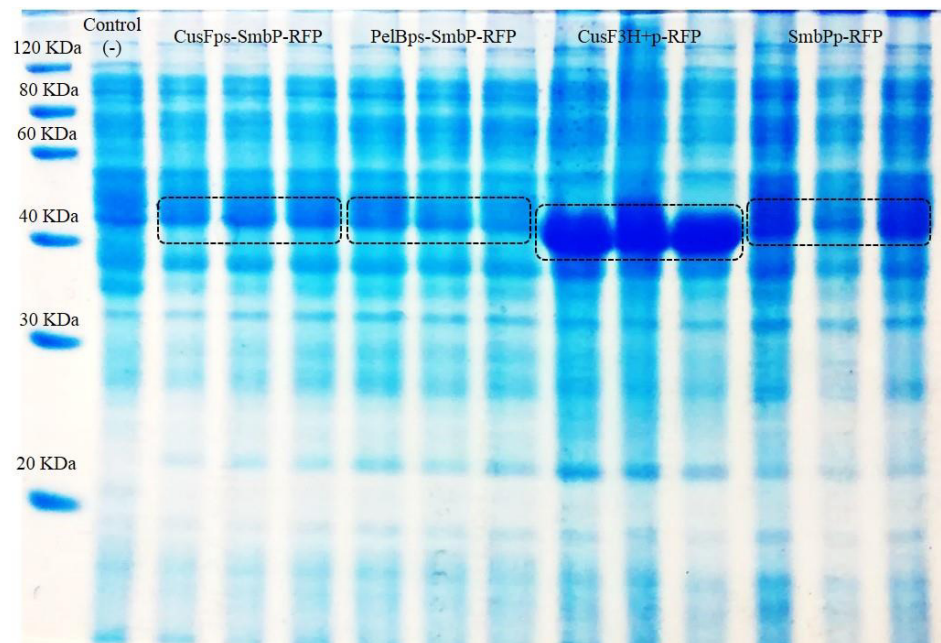


Figura 11. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de proteínas. Fracción insoluble de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.7. Extracción de proteínas periplásmicas de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP por el método lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE

Después de realizar la expresión piloto de proteínas en 30 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina, se llevó a cabo la extracción de las proteínas periplásmicas de cada construcción por el método de lisozima/choque osmótico. Para esto se tomaron los pesos de los tubos antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 4).

Tabla 4. Peso en gramos del sedimento celular de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP para la extracción de proteínas periplásmicas. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
Control negativo	16.2053	16.7261	0.5203
CusFps-SmbP-RFP	16.3578	16.8484	0.4906
PelBps-SmbP-RFP	16.1642	16.5750	0.4108
CusF3H+p-RFP	16.2193	16.6931	0.4738
SmbPp-RFP	16.2186	16.6621	0.4435

Para el control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar), CusFps-SmbP-RFP y CusF3H+p-RFP se resuspendieron en 12 mL de solución hipertónica, mientras que para PelBps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP se resuspendieron en 10 mL de la misma solución. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.04 g/mL. En la Figura 12 se muestran los sedimentos celulares de cada expresión antes de ser sometidos al método lisozima/choque osmótico.

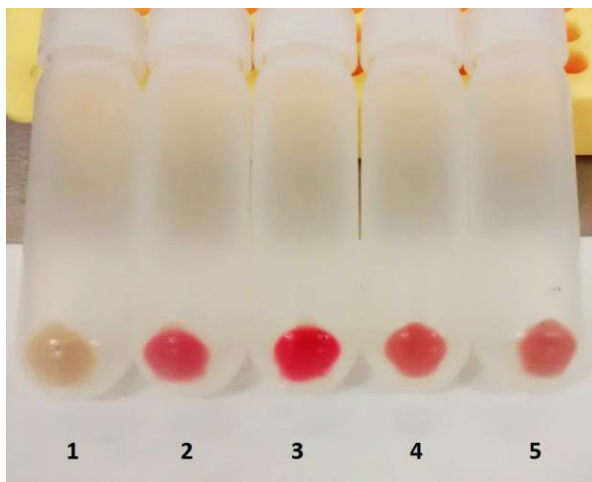


Figura 12. Sedimentos celulares de las expresiones antes de ser sometidos al método lisozima/choque osmótico. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.

Después de obtener la fracción hipertónica (ver Figura 13), los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.04 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas (ver Figura 13) se descartaron los sedimentos celulares. En la Figura 14 se muestran los sedimentos celulares después de ser sometidos al método de lisozima/choque osmótico.

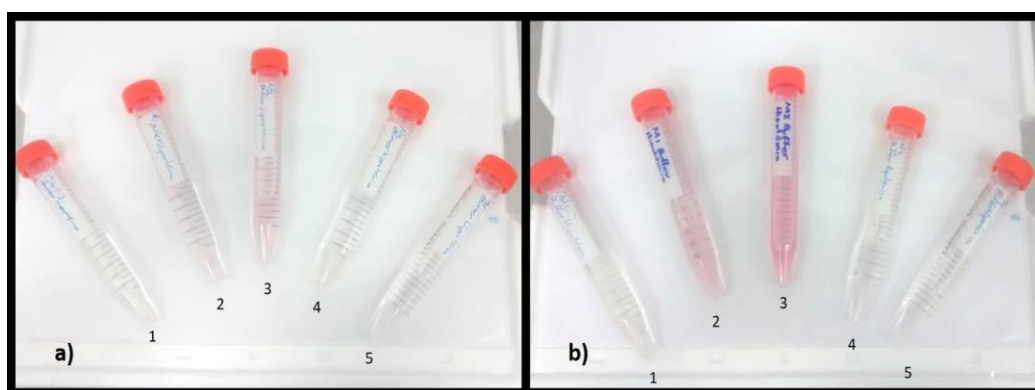


Figura 13. Método lisozima/choque osmótico. a) Fracciones hipertónicas e b) hipotónicas. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.

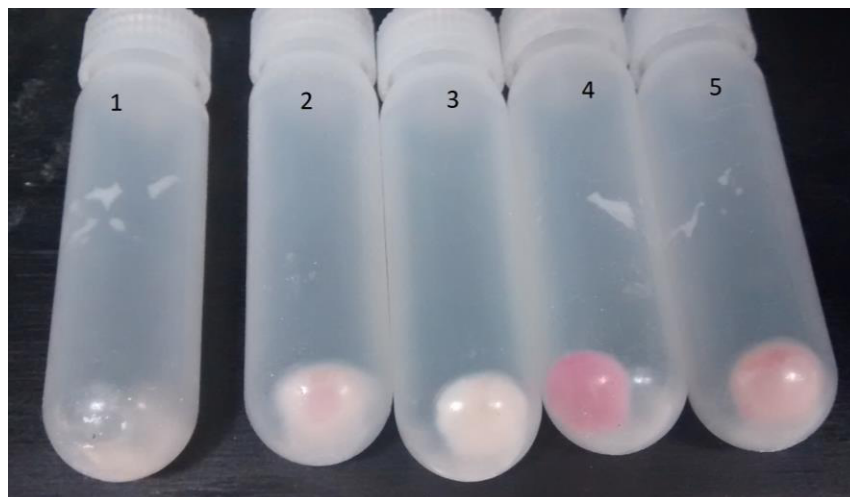


Figura 14. Sedimentos celulares de las expresiones después de ser sometidos al método lisozima/choque osmótico. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP.

Las fracciones hipertónicas e hipotónicas se llevaron a un transiluminador de UV para observar si RFP emitía fluorescencia. De la fracción hipotónica, el tubo 2 y 3 (ver Figura 15) correspondiente a CusFps-SmbP-RFP y PelBps-SmbP-RFP respectivamente, se aprecia la emisión de fluorescencia de estas proteínas.

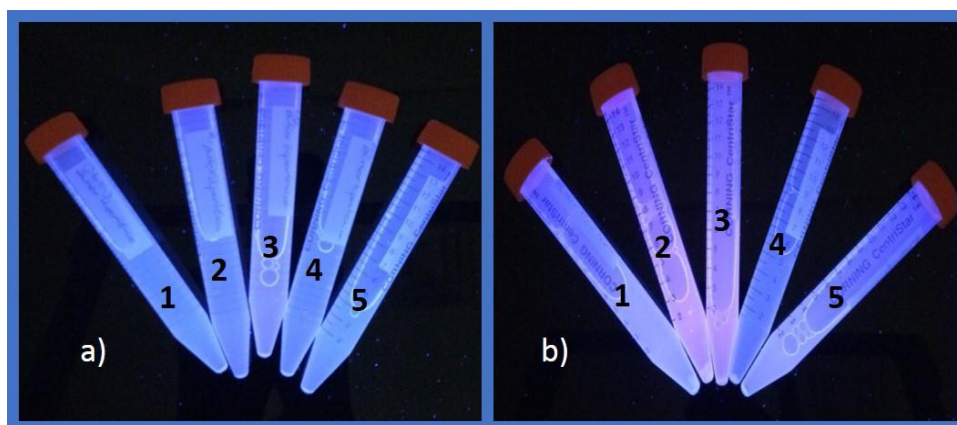


Figura 15. Método lisozima/choque osmótico. a) Fracciones hipertónicas e b) hipotónicas. Tubo 1: Control negativo. Tubo 2: CusFps-SmbP-RFP. Tubo 3: PelBps-SmbP-RFP. Tubo 4: CusF3H+p-RFP. Tubo 5: SmbPp-RFP. Las fracciones se observaron en un transiluminador de UV.

Se analizaron las fracciones hipertónicas e hipotónicas de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para las 3 proteínas es de aproximadamente 40 KDa las cuales se observan en la Figura 16.

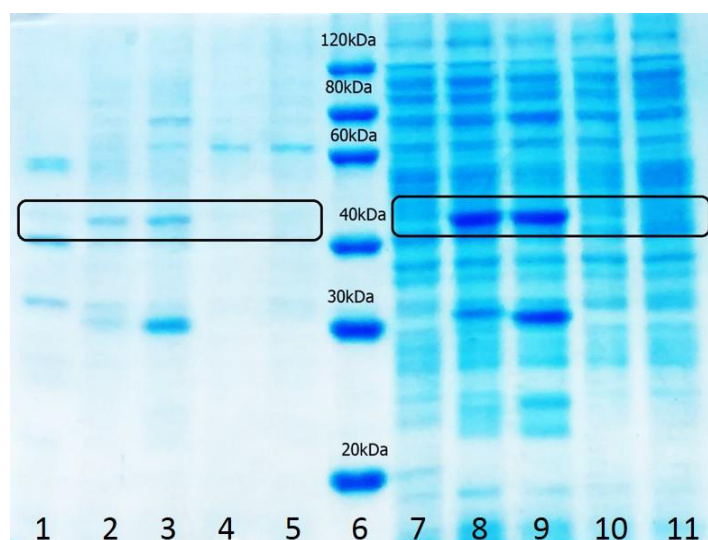


Figura 16. SDS-PAGE 12% de la extracción de proteínas periplásmicas. Carril 1-5: fracciones hipertónicas. Carril 7-11: fracciones hipotónicas. Carril 1 y 7: Control negativo *E. coli* BL21(DE3). Carril 2 y 8: CusFps-SmbP-RFP. Carril 3 y 9: PelBps-SmbP-RFP. Carril 4 y 10: CusF3H+p-RFP. Carril 5 y 11: SmbP-RFP. Carril 6: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.8. Expresión piloto de la enteroquinasa recombinante y análisis por SDS-PAGE

Una vez transformada la construcción de la enteroquinasa en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para la enteroquinasa es de aproximadamente 35 KDa la cual se observa en la Figura 17.

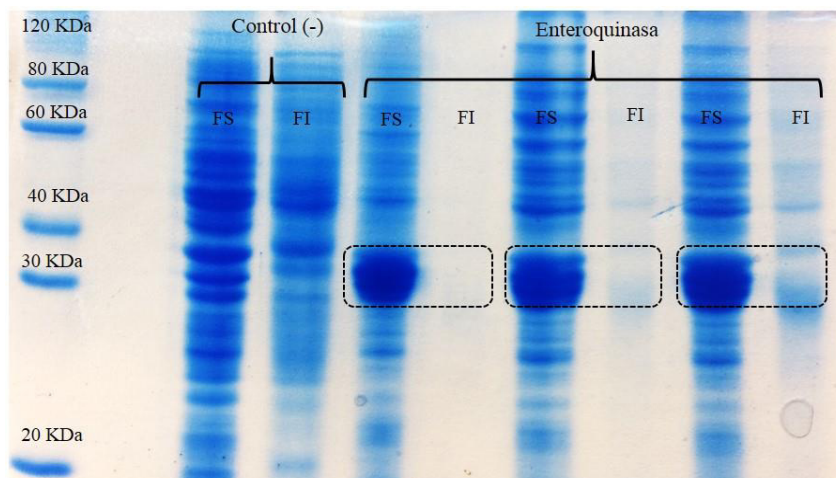


Figura 17. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de la enteroquinasa recombinante. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.9. Extracción periplásmica de la enteroquinasa recombinante por el método

lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE

En este caso se realizó la expresión en 20 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina y posteriormente se sometió al método de lisozima/choque osmótico para la extracción de la enteroquinasa recombinante en el cual se varió la concentración celular. Para esto se tomaron los pesos de los tubos antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 5).

Para el control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar) se resuspendió el sedimento celular en 4.8 mL de solución hipertónica, para Enteroquinasa 1 y 2 se resuspendieron en 3.5 mL, mientras que para Enteroquinasa 3 se resuspendió en 4 mL de la misma solución. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.05 g/mL.

Tabla 5. Peso en gramos del sedimento celular para la extracción periplásmica de la enteroquinasa. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
Control negativo	16.4197	16.6576	0.2379
Enteroquinasa 1	16.2178	16.3911	0.1733
Enteroquinasa 2	16.1366	16.3108	0.1742
Enteroquinasa 3	16.3337	16.5377	0.2040

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.05 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se analizaron las fracciones hipertónicas e hipotónicas de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para la enteroquinasa es de aproximadamente 35 KDa la cual se observa en la Figura 18.

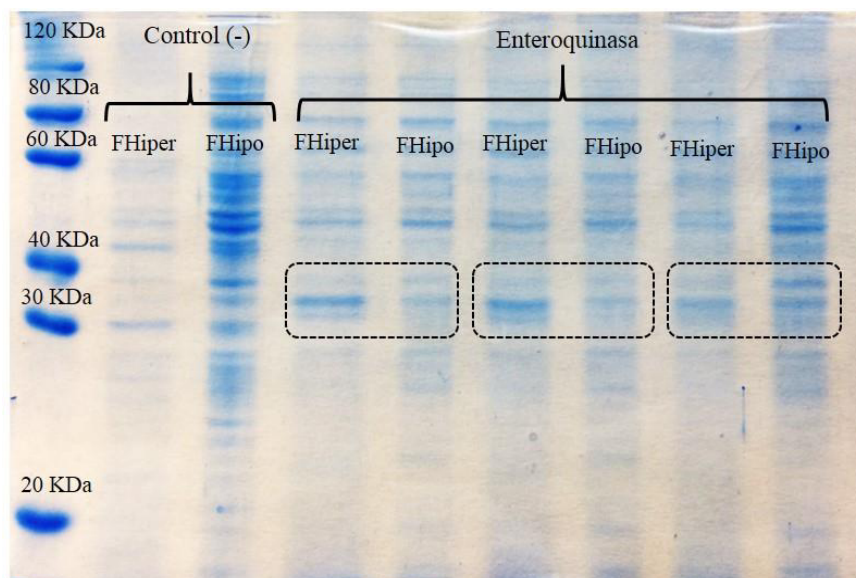


Figura 18. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de la enteroquinasa recombinante. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.10. Expresión piloto de PelBps-SmbP-CSF2 y análisis por SDS-PAGE

Una vez transformada la construcción de PelBps-SmbP-RFP en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para PelBps-SmbP-RFP es de aproximadamente 25 KDa la cual se observa en la Figura 19.

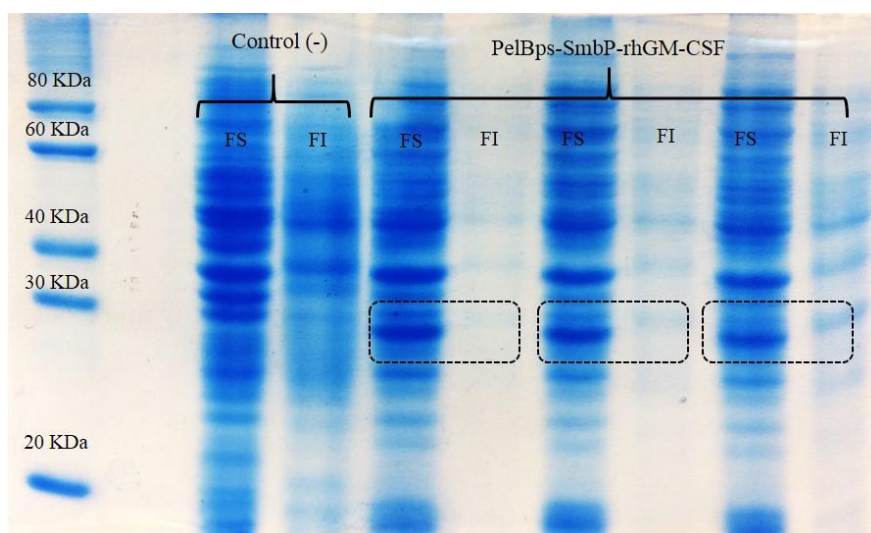


Figura 19. SDS-PAGE 12% de la expresión piloto de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.11. Extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por el método

lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE

Se realizó la expresión en 20 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina y posteriormente se sometió al método de lisozima/choque osmótico para la extracción de PelBps-SmbP-rhGM-CSF en el cual se varió la concentración celular. Para esto se

tomaron los pesos de los tubos antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 6).

Tabla 6. Peso en gramos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-CSF2. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
Control negativo	16.4197	16.6576	0.2379
PelBps-SmbP-rhGM-CSF (1)	16.1877	16.3641	0.1764
PelBps-SmbP-rhGM-CSF (2)	16.2275	16.4211	0.1936
PelBps-SmbP-rhGM-CSF (3)	16.3410	16.5168	0.1758

Para el control negativo (*E. coli* BL21(DE3) sin transformar) se resuspendió el sedimento celular en 4.8 mL de solución hipertónica, para PelBps-SmbP-rhGM-CSF (1) y (3) se resuspendieron en 3.5 mL, mientras que para PelBps-SmbP-rhGM-CSF (2) se resuspendió en 4 mL de la misma solución. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.05 g/mL.

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.05 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se analizaron las fracciones hipertónicas e hipotónicas de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular esperado para PelBps-SmbP-rhGM-CSF es de aproximadamente 26 KDa la cual se observa en la Figura 20.

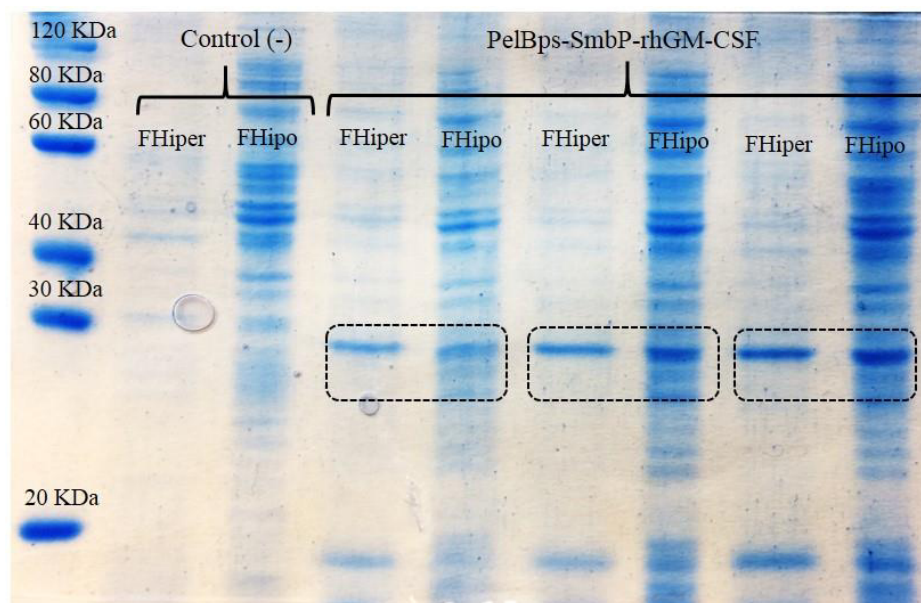


Figura 20. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.12. Microscopía de fluorescencia

Después de realizar la expresión piloto de proteínas se tomó el sedimento celular de 2 mL de cultivo y se resuspendió en 2 mL de agua mQ y se tomó una alícuota para realizar la observación por el microscopio de fluorescencia.

Además de las proteínas CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+-RFP y SmbPp-RFP, se realizó la expresión de SmbPc-RFP para tener un comparativo de la expresión citoplásmica y periplásmica por microscopía de fluorescencia. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. En la Figura 21 se muestran las imágenes tomadas del microscopio de fluorescencia de las diferentes expresiones.

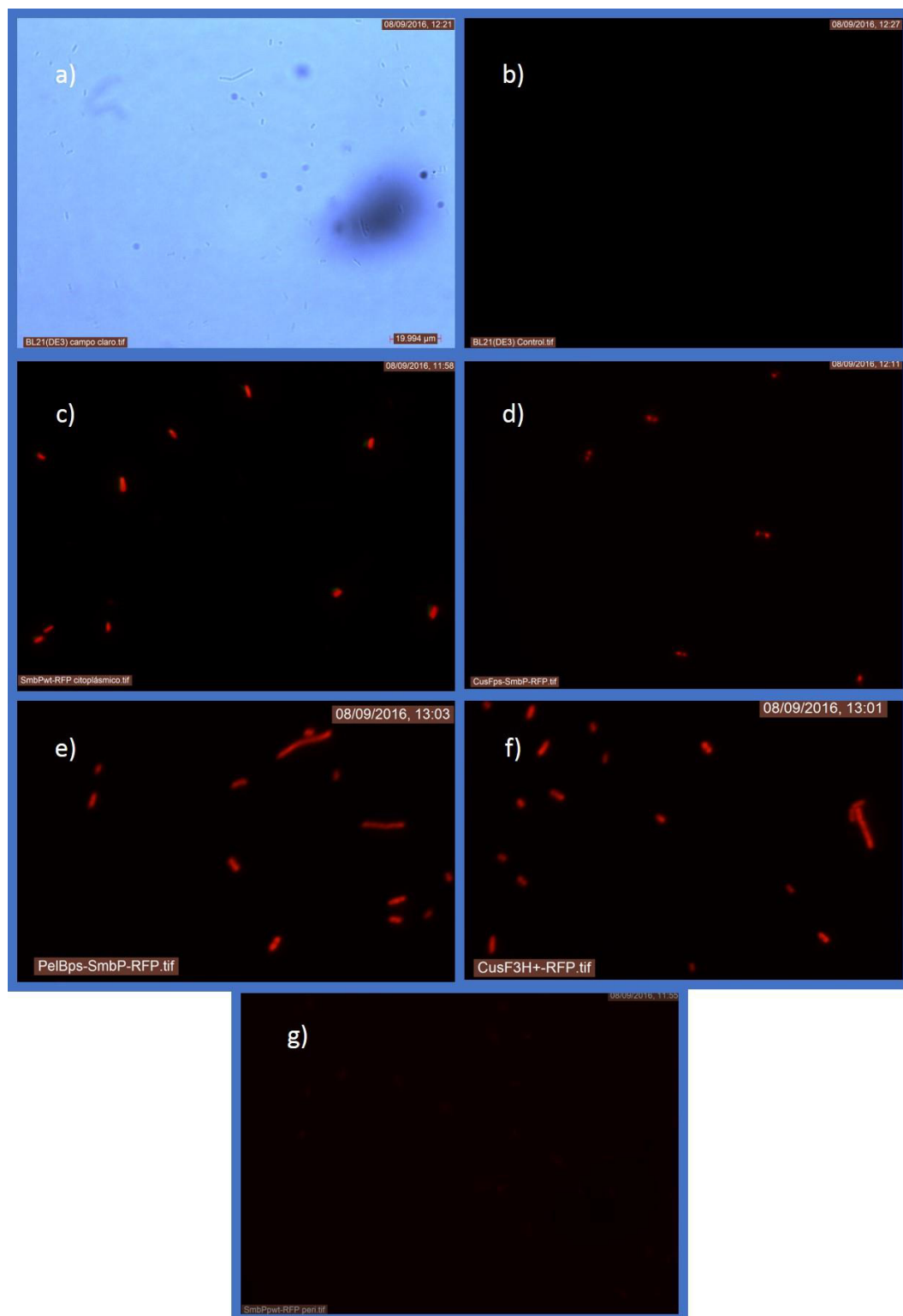


Figura 21. Análisis de la expresión de RFP con las diferentes proteínas de fusión por microscopía de fluorescencia. Campo claro: a) *E. coli* BL21(DE3). Fluorescencia: b) *E. coli* BL21(DE3), c) SmbPc-RFP, d) CusFps-SmbP-RFP, e) PelBps-SmbP-RFP, f) CusF3H+-RFP, g) SmbPp-RFP.

5.13. Purificación de PelBps-SmbP-RFP por cromatografía IMAC

Se obtuvieron los sedimentos celulares de 1 L de cultivo el cual fue dividido en dos tubos y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para realizar la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-RFP. Para esto se tomaron los pesos de los tubos empleados antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 7).

Tabla 7. Peso en gramos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-RFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
PelBps-SmbP-RFP Tubo 1	75.2790	79.2670	3.988
PelBps-SmbP-RFP Tubo 2	75.4256	79.2136	3.788

Se resuspendieron los sedimentos celulares en 80 mL de solución hipertónica obteniendo una concentración celular de 0.05 g/mL.

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.05 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se obtuvieron en total 160 mL de fracción hipertónica e hipotónica de los cuales se tomaron 50 mL de la fracción hipotónica, se diluyeron con 20 mL de solución amortiguadora de lavado y se sometieron a cromatografía IMAC. En la etapa de unión de

la proteína a la columna, se observó un cambio de color de la resina a un color magenta (ver Figura 22).

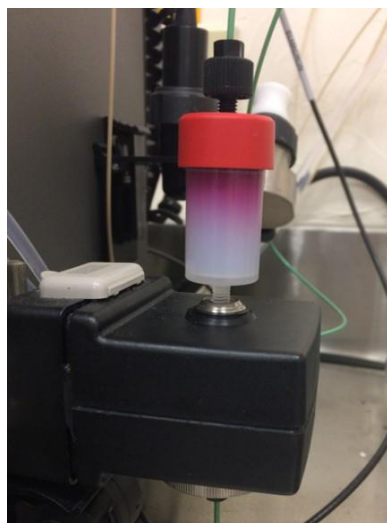


Figura 22. Columna HiTrap™ IMAC FF de 5 mL con PelBps-SmbP-RFP unida.

Posteriormente se realizó la elución con solución amortiguadora de elución como se describe en el punto 4.6.1. De las fracciones de elución obtenidas solo se analizaron las que mostraban una coloración rosa a rojo cereza (ver Figura 23) y que estaban dentro del pico de absorbancia (ver Figura 24) por el método SDS-PAGE (ver Figura 25).

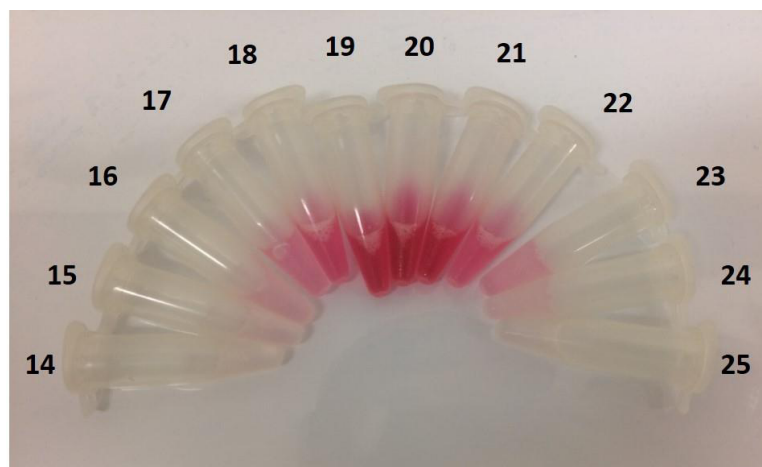


Figura 23. Fracciones de elución obtenidas que mostraron coloración de rosa a rojo cereza.

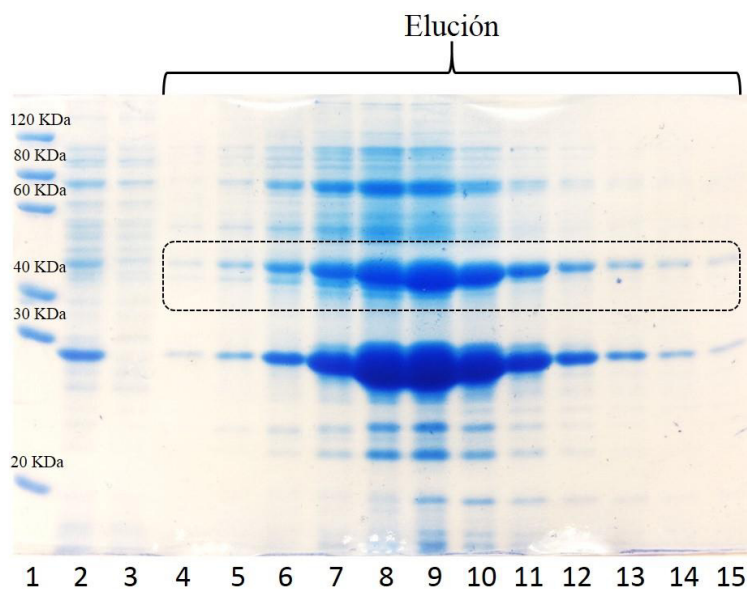


Figura 24. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.

En la siguiente gráfica (ver Figura 25) se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FPLC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para PelBps-SmbP-RFP. Cabe resaltar que se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL.

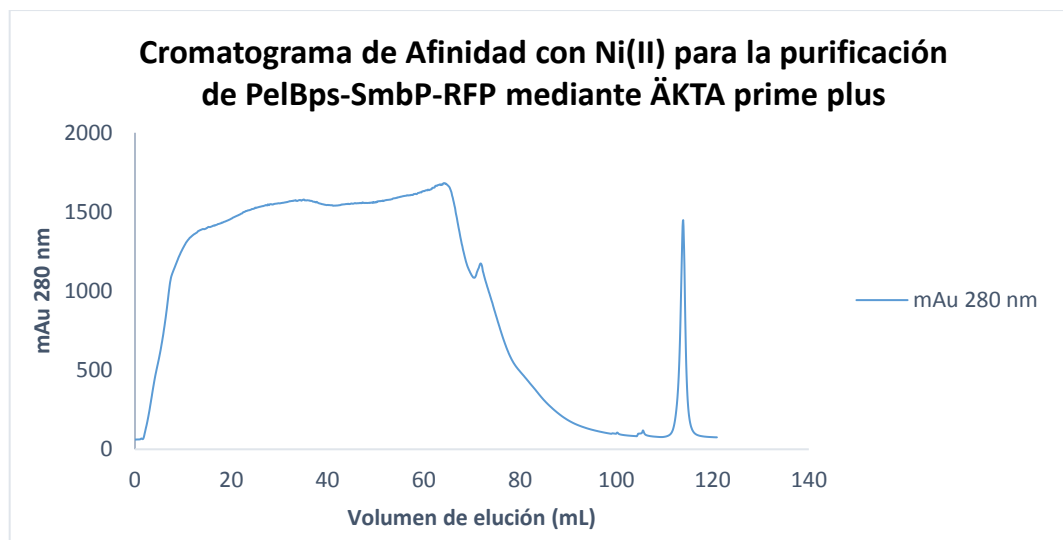


Figura 25. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-RFP.

Para disminuir la viscosidad de la muestra se tomaron 40 mL de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-RFP, se dializaron utilizando solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 500mM, pH 8.0 y se sometió a cromatografía IMAC.

Previo a la elución, la columna se lavó con 2 soluciones amortiguadoras de lavado Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 5 mM pH 8.0 y la otra Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM a pH 8.0. Posteriormente se realizó la elución realizando un gradiente de 0 a 200 mM de imidazol. De las fracciones de elución obtenidas solo se analizaron las que mostraban una coloración rosa a rojo cereza y que estaban dentro del pico de absorbancia por el método SDS-PAGE (ver Figura 26).

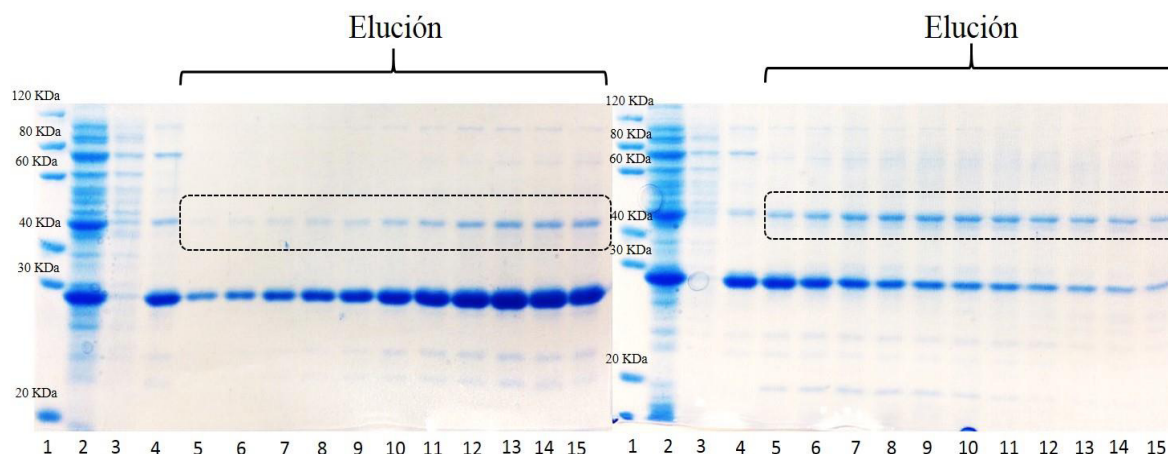


Figura 26. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 5-15: Fracciones de elución.

En la siguiente gráfica (ver Figura 27) se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FPLC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para PelBps-SmbP-RFP. Cabe resaltar que se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL.

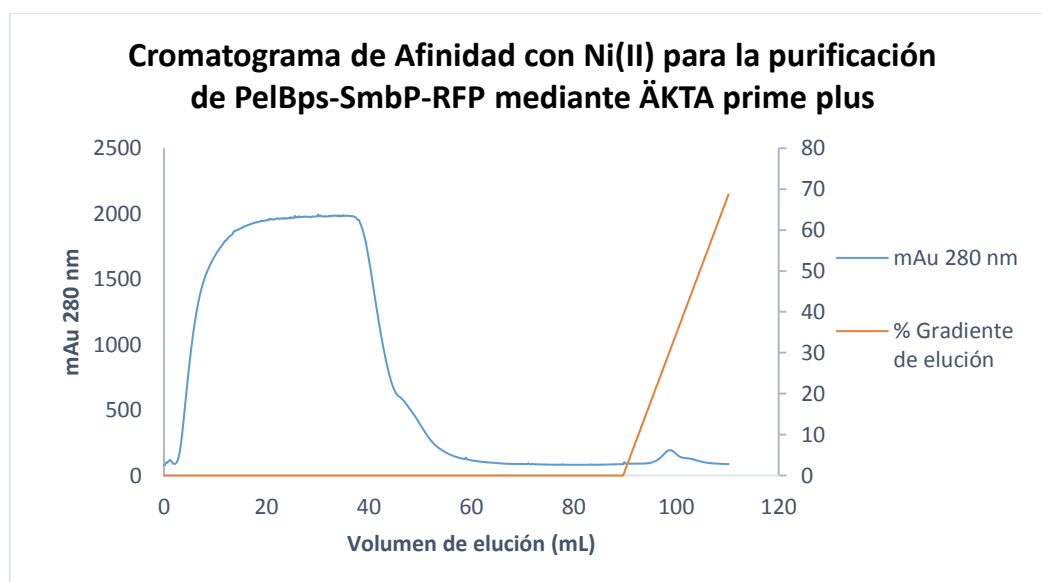


Figura 27. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-RFP por elución con gradiente.

5.14. Cuantificación de PelBps-SmbP-RFP por el método Bradford

Se cuantificó la concentración de proteínas de las fracciones de elución obtenidas en la cromatografía IMAC. En la Tabla 8 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración.

Tabla 8. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.

	Concentración de estándares	Agua	Reactivo Bradford	Volumen de muestra	Absorbancia 595 nm
Estándar 1	40 μ L Stock 1 mg/mL	0 μ L	200 μ L	5 μ L	0.724
Estándar 2	30 μ L Stock 1 mg/mL	10 μ L	200 μ L	5 μ L	0.645
Estándar 3	20 μ L Stock 1 mg/mL	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.536
Estándar 4	20 μ L Estándar 3	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.414
Estándar 5	20 μ L Estándar 4	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.344

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a la longitud de onda a 595 nm de las muestras a analizar y se realizaron los cálculos correspondientes con la ecuación obtenida de la gráfica de la curva de calibración (ver Figura 28).

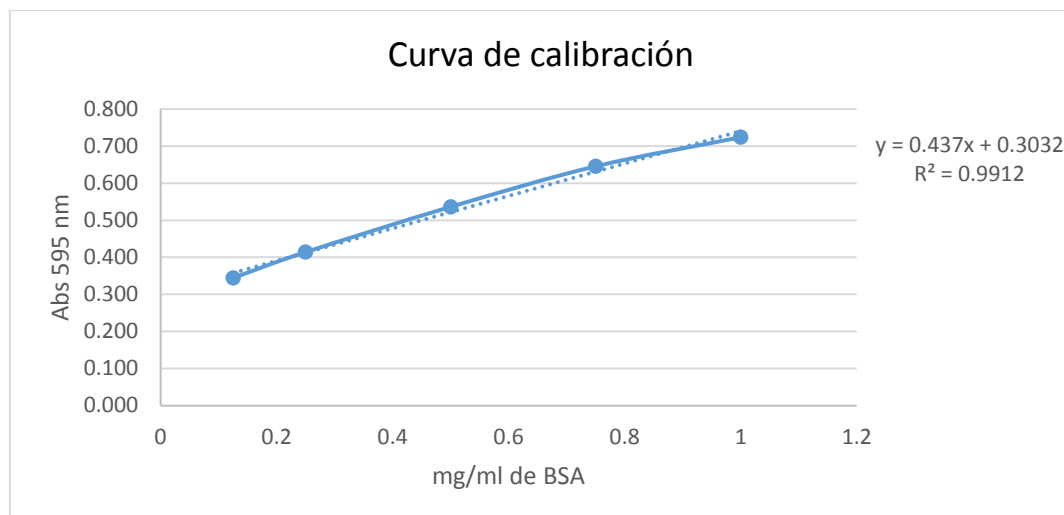


Figura 28. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm para PelBps-SmbP-RFP.

Se obtuvo una concentración de 4.57 mg/mL de PelBps-SmbP-RFP de las fracciones analizadas a partir de los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta a partir de la absorbancia obtenida que fue de 0.703.

5.15. Corte de la proteína de fusión PelBps-SmbP de RFP con enteroquinasa y análisis por SDS-PAGE

Se cortó 1 mg de proteína PelBps-SmbP-RFP con enteroquinasa para posteriormente realizar la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada previamente con iones níquel. Posterior a la incubación de la muestra con la resina, se realizaron 4 lavados con solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1 y finalmente se realizó la elución de la proteína de fusión con solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. Se analizaron las fracciones obtenidas por SDS-PAGE como se muestra en la Figura 29.

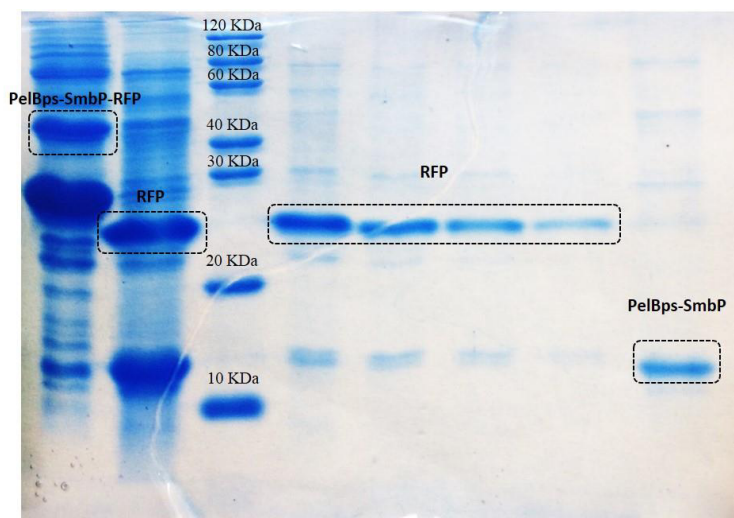


Figura 29. SDS-PAGE 15% de la remoción de la proteína PelBps-SmbP de RFP después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se tomaron muestra antes y después del corte y posterior a la purificación por resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel.

5.16. Purificación de CusFps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP por cromatografía

IMAC

Se obtuvieron los sedimentos celulares de 1 L de cultivo el cual fue dividido en dos tubos y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para realizar la extracción periplásmica de CusFps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP. Para esto se tomaron los pesos de los tubos empleados antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 9).

Se resuspendieron los sedimentos celulares de CusFps-SmbP-RFP en 35 mL de solución hipertónica mientras que SmbPp-RFP se resuspendió en 25 mL obteniendo una concentración celular de 0.1 g/mL.

Tabla 9. Peso en gramos del sedimento celular para la extracción periplásmica de SmbPp-RFP y CusFps-SmbP-RFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
CusFps-SmbP-RFP Tubo 1	75.2794	78.7739	3.4945
CusFps-SmbP-RFP Tubo 2	75.3733	79.0517	3.6784
SmbPp-RFP Tubo 1	75.3632	77.8449	2.4817
SmbPp-RFP Tubo 2	75.4340	77.7001	2.2661

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.1 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se obtuvieron en total 70 mL de fracción hipotónica de CusFps-SmbP-RFP y 50 mL de SmbPp-RFP. Se tomaron 35 mL de la fracción hipotónica de CusFps-SmbP-RFP y se dializó con solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0 y se sometió a cromatografía IMAC. Para SmbPp-RFP se tomaron los 50 mL de la fracción hipotónica, se le ajustó a pH 8.0 con Tris-HCL y se sometió a cromatografía IMAC.

Previo a la elución, la columna se lavó con solución amortiguadoras de lavado conteniendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, 5mM Imidazol a pH 8.0. Posteriormente se realizó la elución realizando un gradiente de 0 a 200 mM de imidazol para CusFps-SmbP-RFP mientras que para SmbPp-RFP se realizó una elución directa con 200mM de imidazol. De las fracciones de elución obtenidas para CusFps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP solo se analizaron las que mostraban una coloración rosa a rojo cereza y que estaban dentro del pico de absorbancia por el método SDS-PAGE (ver Figura 30 y 31).

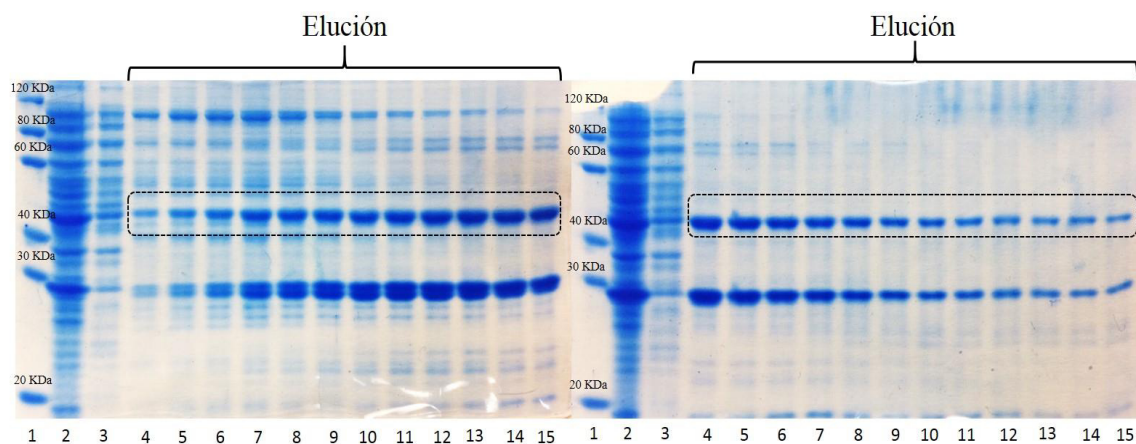


Figura 30. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de CusFps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.

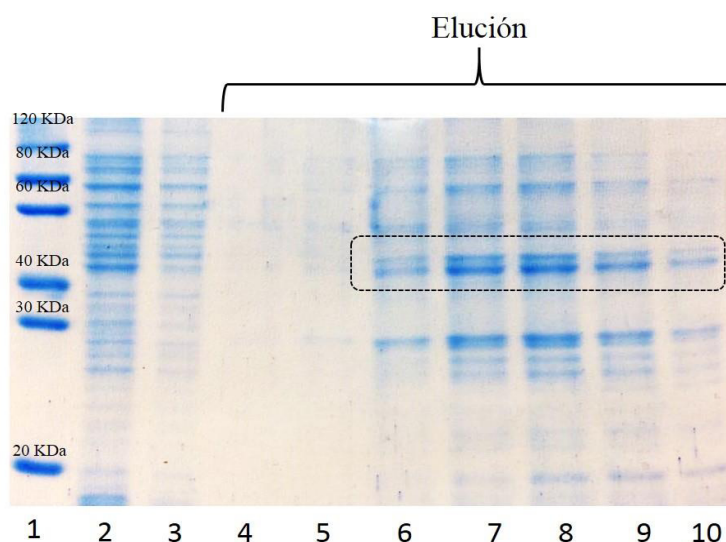


Figura 31. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de SmbPp-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción hipertónica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-10: Fracciones de elución.

En las siguientes gráficas se observa los cromatogramas de afinidad para CusFps-SmbP-RFP (ver Figura 32) y SmbPp-RFP (ver Figura 33) obtenidos con el equipo FPLC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para ambas proteínas. Cabe resaltar que se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL.

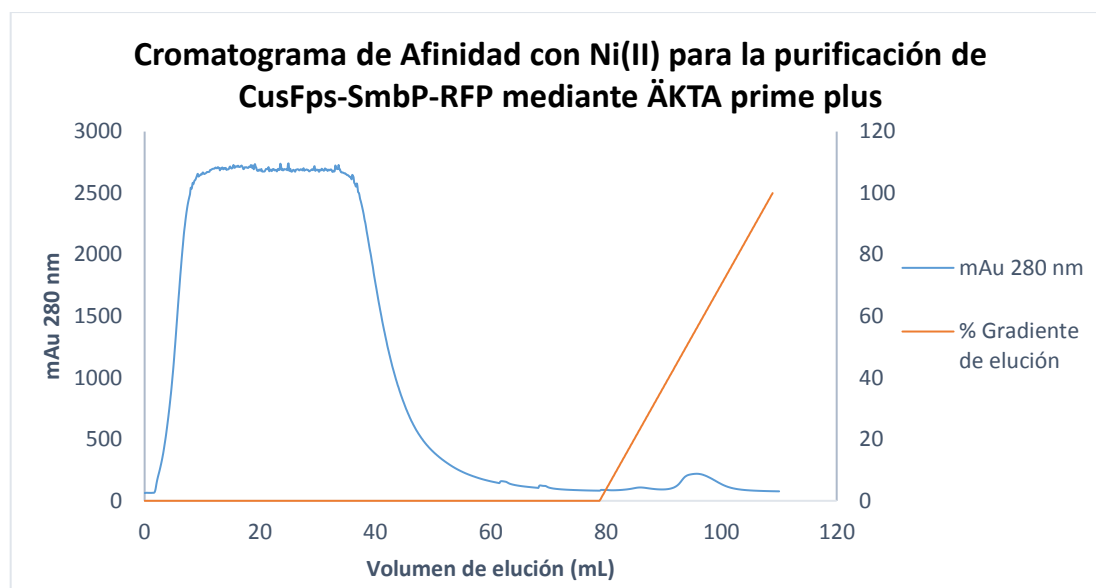


Figura 32. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para CusFps-SmbP-RFP con elución por gradiente.

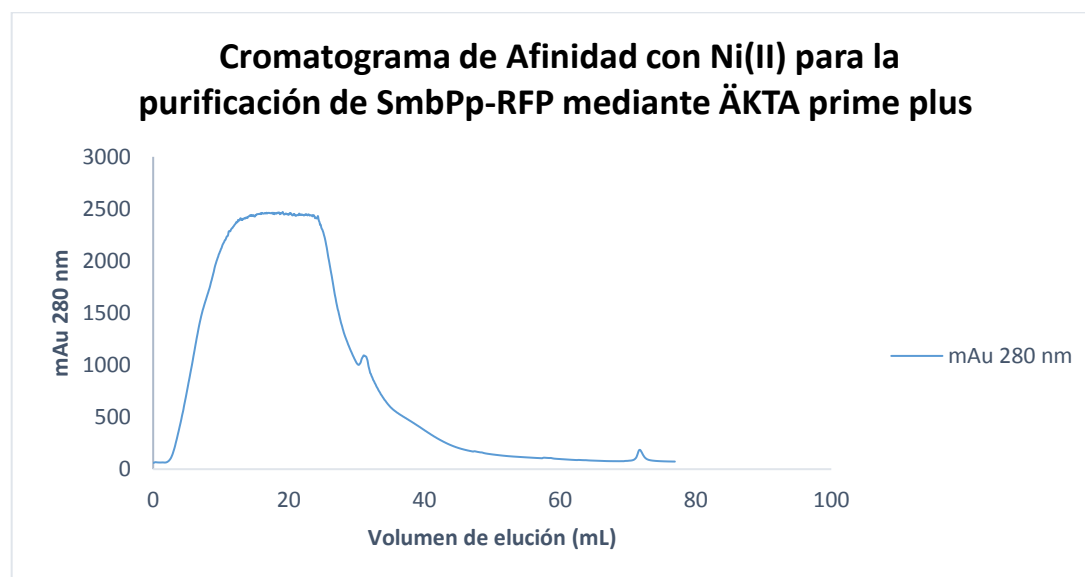


Figura 33. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPp-RFP.

5.17. Purificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por cromatografía IMAC

Se obtuvieron los sedimentos celulares de 1 L de cultivo el cual fue dividido en dos tubos y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para realizar la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. Para esto se tomaron los pesos de los tubos

empleados antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 9).

Se resuspendieron los sedimentos celulares en 30 mL de solución hipertónica obteniendo una concentración celular de 0.1 g/mL.

Tabla 10. Peso en grmos del sedimento celular para la extracción periplásmica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
PelBps-SmbP-rhGM-CSF Tubo 1	75.3486	78.4132	3.0646
PelBps-SmbP-rhGM-CSF Tubo 2	75.3665	78.5277	3.1612

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica. Se obtuvo una concentración celular aproximada de 0.1 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se obtuvieron en total 50 mL de fracción hipertónica y 50 mL de fracción hipotónica las cuales se mezclaron y se sometieron a cromatografía IMAC. Posteriormente se realizó la elución con solución amortiguadora de elución realizando un gradiente de 0 a 200 mM de imidazol. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (ver Figura 30).

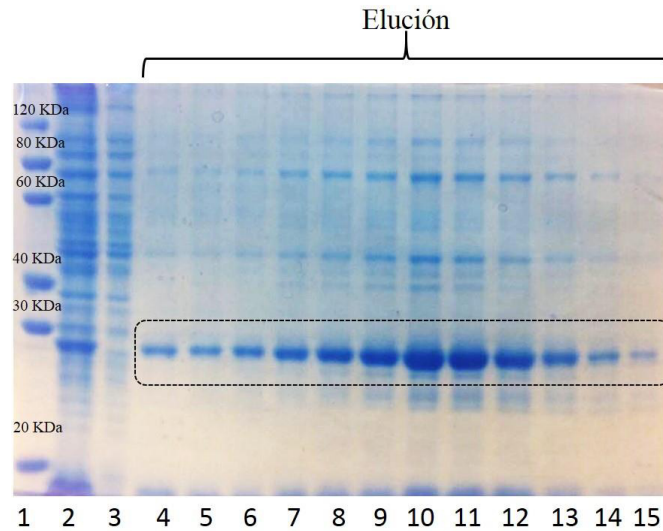


Figura 34. SDS-PAGE de la purificación de la fracción hipotónica de PelBps-SmbP-rhGM-CSF. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: Fracción periplásmica. Carril 3: fase no unida. Carril 4-15: Fracciones de elución.

En la siguiente gráfica (ver Figura 35) se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FPLC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para PelBps-SmbP-rhGM-CSF. Cabe resaltar que se obtuvieron fracciones de 0.5 mL.

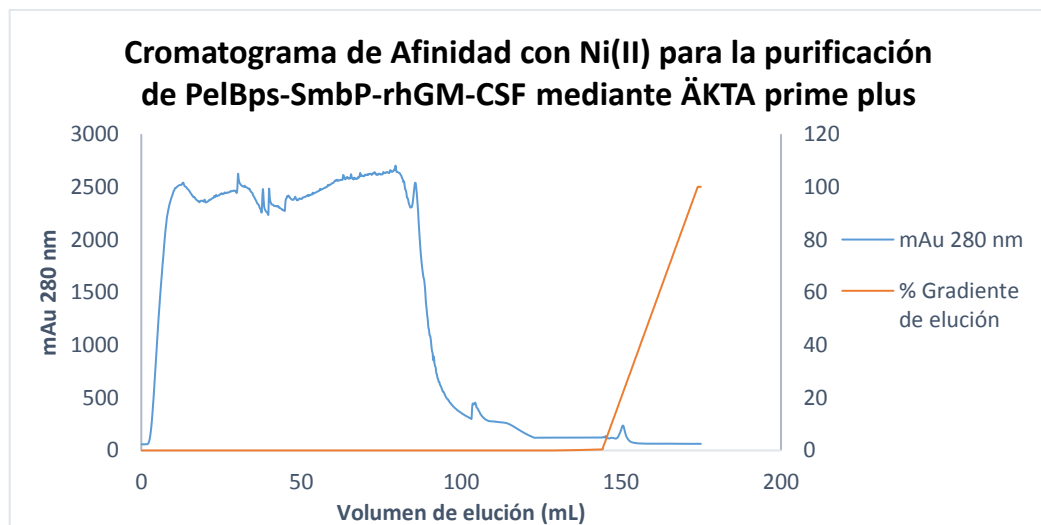


Figura 35. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para PelBps-SmbP-rhGM-CSF2 con elución por gradiente.

5.18. Cuantificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por el método Bradford

Se cuantificó la concentración de proteínas de las fracciones de elución obtenidas en la cromatografía IMAC. En la Tabla 11 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración.

Tabla 11. Datos de la curva de calibración para el método Bradford

	Concentración de estándares	Agua	Reactivo Bradford	Volumen de muestra	Absorbancia 595 nm
Estándar 1	40 μ L Stock 1 mg/mL	0 μ L	200 μ L	5 μ L	0.679
Estándar 2	30 μ L Stock 1 mg/mL	10 μ L	200 μ L	5 μ L	0.568
Estándar 3	20 μ L Stock 1 mg/mL	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.454
Estándar 4	20 μ L Estándar 3	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.371
Estándar 5	20 μ L Estándar 4	20 μ L	200 μ L	5 μ L	0.315

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a la longitud de onda a 595 nm de las muestras a analizar y se realizaron los cálculos correspondientes con la ecuación obtenida de la gráfica de la curva de calibración (ver Figura 36).

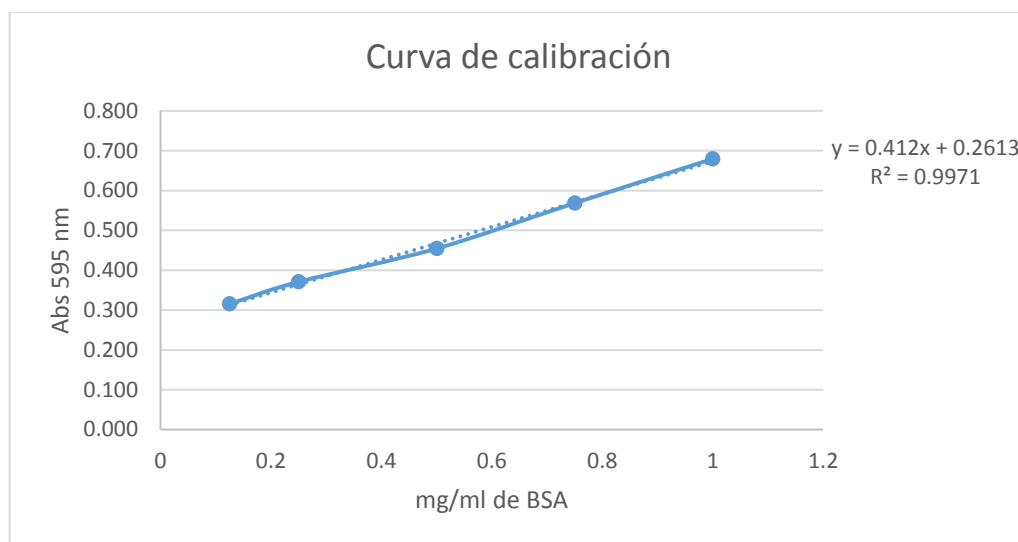


Figura 36. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm para PelBps-SmbP-rhGM-CSF.

Se obtuvo una absorbancia promedio de 0.603, después de realizar los cálculos correspondientes con la ecuación de la curva se obtuvo una concentración de 0.74 mg/mL y un rendimiento de 4.21 mg de PelBps-SmbP-rhGM-CSF por litro de cultivo expresado.

5.19. Corte de la proteína de fusión PelBps-SmbP de rhGM-CSF con enteroquinasa y análisis por SDS-PAGE

Se cortaron 2 mg de proteína PelBps-SmbP-rhGM-CSF con enteroquinasa para posteriormente realizar la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada previamente con iones níquel. Posterior a la incubación de la muestra con la resina, se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1 y finalmente se realizó la elución de la proteína de fusión con solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. Se analizaron las fracciones obtenidas por SDS-PAGE como se muestra en la Figura 32.

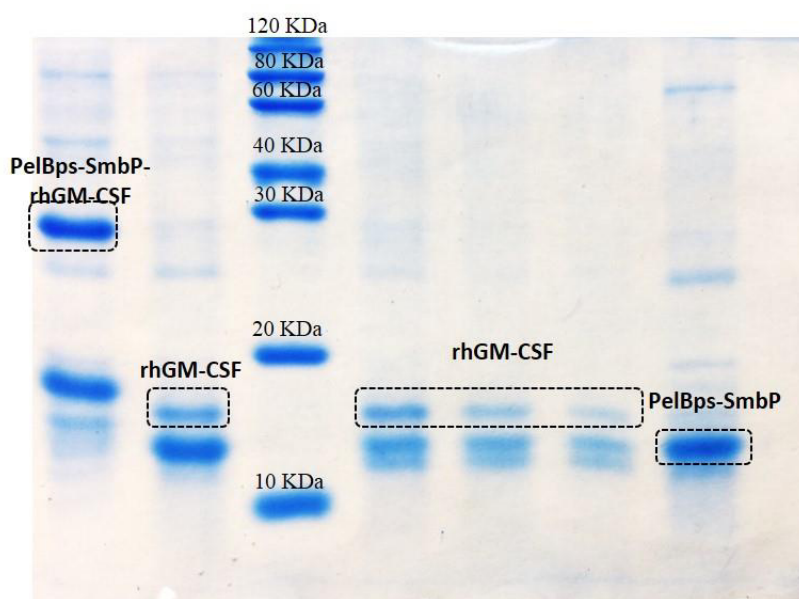


Figura 37. SDS-PAGE de la remoción de la proteína PelBps-SmbP de rhGM-CSF después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se tomaron muestra antes y después del corte y posterior a la purificación por resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel.

5.20. Cuantificación de RFP por espectrofotometría de fluorescencia

Se cuantificó la concentración de RFP de las fracciones de elución obtenidas en la cromatografía IMAC. En la Tabla 12 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración.

Tabla 12. Datos de la curva de calibración para la cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia

Estándar	Concentración (ng/mL)	Intensidad promedio \pm DS (RFU)
1	70000	331.97 ± 13.74
2	50000	246.33 ± 5.77
3	20000	106.3 ± 5.46
4	10000	54.07 ± 2.23
5	5000	29.97 ± 1.19
6	2500	13.9 ± 0.53
7	1000	5.87 ± 0.21

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de las muestras a analizar utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes con la ecuación obtenida de la gráfica de la curva de calibración (ver Figura 38).

En la Tabla 13 se muestran los datos obtenidos de las mediciones de PelBps-SmbP-RFP, CusFps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP.

Muestra	Dilución	Intensidad Promedio (RFU)	Concentración (ng/mL)	Concentración (mg/mL)
CusFps-SmbP-RFP	1:10	171.7	353803	0.3538
PelBps-SmbP-RFP 1	1:10	238.3	495364	0.4954
PelBps-SmbP-RFP 2	1:10	110.1	222598	0.2226
SmbPp-RFP	Sin diluir	26.5	4479.6	0.0045

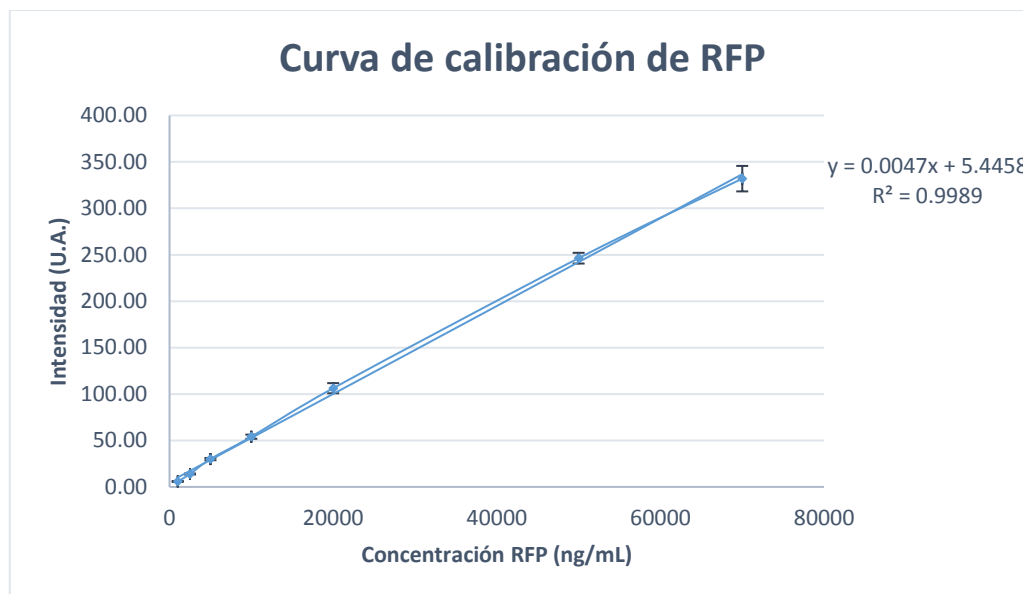


Figura 38. Gráfica de la curva de calibración de RFP a 585 nm de longitud de onda de emisión.

Para CusFps-SmbP-RFP se obtuvo una concentración de 0.3538 mg/mL de las fracciones recolectadas (9.5 mL). Considerando este volumen se obtienen 3.3611 mg de estas fracciones, considerando que se purificaron 35 mL de los 70 mL totales obtenidos en la fracción hipotónica del método lisozima/choque osmótico, se obtiene un total de 6.7222mg de RFP por 1 L de cultivo expresado.

Para PelBps-SmbP-RFP 1 se obtuvo una concentración de 0.4954 mg/mL de las fracciones recolectadas (4 mL). Considerando este volumen se obtienen 1.9816 mg de estas fracciones. Considerando que se purificaron 40 mL de los 160 mL totales obtenidos en la fracción hipotónica del método lisozima/choque osmótico, se obtiene un total de 7.9264 mg de RFP por 1 L de cultivo expresado.

Para SmbPp-RFP se obtuvo una concentración de 0.0045 mg/mL de las fracciones recolectadas (1.5 mL). Considerando este volumen se obtienen 0.0068 mg de estas

fracciones. Como se purificó el total de la fracción hipotónica (50 mL) obtenida en el método de lisozima/choque osmótico, se obtiene un total de 0.0068 mg de RFP por 1 L de cultivo expresado.

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se realizaron diferentes versiones de la proteína de fusión periplásmica SmbP intercambiando su péptido señal nativo por el de otras proteínas, esto con la finalidad de mejorar los niveles de expresión en el periplasma de *E. coli* usando RFP como proteína reportera. Se realizó el análisis de diferentes péptidos señal para encontrar el mejor para sustituir el de SmbP encontrando que el de la proteína CusF era un buen candidato debido a los resultados obtenidos por Cantú-Bustos et al. [24] donde los niveles de expresión de RFP en el periplasma de *E. coli* fueron altos comparados con los de Vargas-Cortez et al. [22] y el de la proteína PelB ya que es uno de los más utilizados en vectores comerciales como el sistema pET para la expresión de proteínas heterólogas en el periplasma de *E. coli* [43].

Aunado a esto, los péptidos señal de estas proteínas contienen características esenciales para un transporte favorable de las proteínas al periplasma en *E. coli*, entre ellas, la presencia de un aminoácido básico (como la lisina) inmediatamente después del codón de inicio en la región -n parece mejorar la tasa de secreción de la proteína, sin embargo no solo es necesaria la presencia de un aminoácido básico, también es necesario un codón iniciador de traducción fuerte como AAA siendo el mejor y AAT siendo el

segundo mejor los cuales codifican para lisina y arginina respectivamente. La región -h de estos péptidos señal es altamente hidrofóbica siendo también una característica esencial para el reconocimiento del péptido señal por la maquinaria Sec, además que el de PelB posee una glicina en el centro de esta región cumpliendo la función de disruptor de hélices jugando un rol importante en el transporte de las proteínas [15].

En las primeras expresiones piloto realizadas de las diferentes versiones de SmbP, junto con su versión nativa y con CusF3H+p, se evaluó la expresión de manera visual. Se observó el color rosa característico de RFP en el sedimento celular de PelBps-SmbP-RFP, CusFps-SmbP-RFP , SmbPp-RFP y CusF3h+p, sin embargo, PelBps-SmbP, CusFps-SmbP y CusF3H+p tenían una coloración más rosa que la que presentaba SmbP nativa (ver Figura 9). Esto sugiere que la proteína se está produciendo en mayor cantidad y de manera activa en estas versiones de SmbP y CusF3H+p. Al visualizar la expresión piloto mediante electroforesis de gel de poliacrilamida se notó que las bandas de expresión para las diferentes versiones de SmbP y CusF3H+ eran más grande que las presentadas con SmbP nativa (ver Figura 16).

Un aspecto a considerar después de expresar una proteína en el periplasma de *E. coli* es la extracción de la misma de este compartimento. El choque osmótico y la formación de esferoplastos inducidos por lisozima son métodos utilizados ampliamente para este propósito. Así mismo, se ha utilizado la combinación de los mismos para obtener mejores resultados en la extracción periplásmica de las proteínas de interés. En nuestro estudio, se utilizó el método de lisozima/choque osmótico reportado por French et al. [41] para la extracción de nuestras proteínas con ciertas modificaciones. El uso de lisozima combinado con el método de choque osmótico en la presencia de EDTA ha demostrado

que favorece la liberación de las proteínas periplásmicas debido a que la lisozima cataliza la degradación del enlace entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil-glucosamina ya que se promueve la formación de esferoplastos liberando todo el contenido del periplasma [42]. Algunas de las modificaciones realizadas fueron la concentración celular en las diferentes soluciones y el tiempo de exposición con los sedimentos celulares, esto para permitir un mayor tiempo de contacto de la solución con el sedimento celular y favorecer la extracción de las proteínas del periplasma de *E. coli*.

En la Figura 14 se muestran las diferentes fracciones hipertónicas e hipotónicas de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP obtenidas después de ser sometidas al método lisozima/choque osmótico en donde se puede observar que en la fracción hipotónica de CusFps-SmbP-RFP y PelBps-SmbP-RFP se nota una coloración rosa de gran intensidad comparado con la versión SmbPp-RFP y CusF3H+p-RFP. Esto sugiere que la extracción de las proteínas periplásmicas se está llevando de manera satisfactoria siendo más notorio en la versión de PelBps-SmbP-RFP ya que es la que muestra una coloración más rosa que las demás. Se realizó el análisis por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones obtenidas y se pudo apreciar las bandas de expresión aproximadamente a 40 KDa para PelBps-SmbP y CusFps-SmbP-RFP, sin embargo, para SmbPp-RFP y CusF3H+p-RFP no fue posible apreciar las bandas de expresión. Analizando los datos obtenidos por Vargas-Cortez et al. [22] se observa que las bandas de expresión periplásmica de RFP utilizando CusFps-SmbP y PelBps-SmbP (ver Figura 16) son más grandes que lo reportado por ellos utilizando SmbP nativa. Así mismo, comparando los resultados obtenidos por Cantú-Bustos et al. [44] donde utilizan CusF para la expresión periplásmica de RFP, también es posible apreciar que las bandas

de expresión periplásmica de RFP con CusFps-SmbP y PelBps-SmbP son más grandes que lo que ellos obtienen.

Se evaluó la fluorescencia de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP, CusF3H+p-RFP y SmbPp-RFP en el periplasma de *E. coli* utilizando microscopía de fluorescencia. En este estudio se pudo observar que las versiones de CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+p con RFP emitían una mayor intensidad de fluorescencia comparado con la versión nativa de SmbP (ver Figura 21). PelBps-SmbP-RFP fue la que mostro mayor intensidad de fluorescencia comparado con las demás expresiones lo que sugiere que es la que produce mayor cantidad de RFP en su forma activa. Esto concuerda con las expresiones pilotos antes mencionadas ya que la versión de PelBps-SmbP era la que mostraba una coloración más rosa comparada con las demás expresiones.

Así mismo se observó por microscopía de fluorescencia que las proteínas expresadas en el periplasma de *E. coli* mostraban una distribución en halo en la bacteria, pero también había una tendencia a acumularse en los polos de la misma (ver Figura 21). Esto concuerda con lo reportado por Santini et al. [45] en donde ellos expresan GFP en el periplasma de *E. coli* utilizando un péptido señal de la ruta Tat en donde pudieron observar que al momento de translocalizarse GFP en el periplasma, había una distribución en halo en la bacteria pero también se mostraba una tendencia de distribuirse en los polos de la misma. Esto nos sugiere que RFP con las diferentes versiones de SmbP y CusF3H+p está siendo translocalizada en el periplasma de *E. coli* sin embargo, debido a la baja intensidad de fluorescencia emitida por RFP con la versión nativa de SmbP, no fue posible apreciar esta característica.

Se realizó la purificación de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP utilizando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados utilizando iones Ni(II). Como ya se había mencionado anteriormente, SmbP tiene la capacidad de unirse a diversos metales divalentes entre ellos Ni(II) y Cu(II) [20].

En la Figura 24 se muestra la purificación de la proteína PelBps-SmbP-RFP en donde se aprecia un gran rendimiento de la proteína unida a la columna cargada con iones Ni(II), sin embargo la pureza de la misma no es la deseada como lo reportado por Vargas-Cortez et al. [22] donde la pureza de SmbPp-RFP es alta. Con la finalidad de mejorar la pureza de la proteína se optó por realizar la diálisis de la fracción hipotónica obtenida por el método lisozima/choque osmótico, esto con el propósito de disminuir la viscosidad de la misma ya que esto podría estar dificultando la pureza de la proteína. Así mismo, se realizaron lavados con imidazol a concentraciones de 5 mM y 10 mM y se realizó un gradiente de elución de 0 a 200 mM de imidazol con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas. En la Figura 26 se puede apreciar la purificación de PelBps-SmbP-RFP con altos niveles de pureza.

En cuanto a la purificación de CusFps-SmbP-RFP, viendo los resultados obtenidos con PelBps-SmbP-RFP, se decidió también realizar una diálisis de la muestra con el propósito de disminuir la viscosidad de la misma. Se realizaron lavados con imidazol 5 mM y se realizó una elución por gradiente de 0 a 200 mM de imidazol. En la Figura 30 se observa la purificación de CusFps-SmbP-RFP obteniendo buenos niveles de pureza, en contraste a los obtenidos por Vargas-Cortez et al. [22] sin embargo, es necesario mejorar la pureza de la misma probando diferentes condiciones de lavado.

Por otra parte, en la Figura 31 se puede observar la purificación de SmbPp-RFP en donde la diálisis de la fracción hipotónica no fue necesaria debido a que la viscosidad de la misma no era tanta o casi nula, comparado con CusFps-SmbP-RFP y PelBps-SmbP-RFP. Se realizaron lavados con 5 mM de imidazol y se realizó una elución en un solo paso utilizando 200 mM de imidazol. Se puede observar que la pureza fue buena y comparable al trabajo realizado por Vargas-Cortez et al. [22].

Cabe mencionar que en el análisis por SDS-PAGE de la purificación de CusFps-SmbP-RFP, PelBps-SmbP-RFP y SmbPp-RFP se puede apreciar la aparición de una banda de expresión aproximadamente a 29 KDa lo cual nos puede indicar que es nuestra proteína degradada.

Se realizó la remoción de la proteína PelBps-SmbP de RFP utilizando la enzima enteroquinasa. En la Figura 29 se puede observar la diferencia en pesos moleculares posterior al corte lo cual nos indica que la proteína PelBps-SmbP fue removida satisfactoriamente de RFP. Este resultado coincide con lo reportado con respecto a la remoción de proteínas que contienen el sitio de corte de enteroquinasa observando patrones similares [22, 24]. Así mismo, se puede observar que la banda de RFP obtenida es de mayor tamaño a la reportada por Cantú-Bustos et al. [24] lo cual nos indica que se está produciendo mayor cantidad de RFP con PelBps-SmbP. Cabe destacar que la remoción de la proteína de fusión no afecta la actividad ya que la muestra aún conservaba el color característico de RFP.

Para cuantificar la cantidad de RFP obtenida con las diferentes versiones de SmbP, se procedió a realizar una curva de calibración por fluorescencia utilizando RFP como referencia. Se midieron puntos a diferentes concentraciones de RFP (1000 ng/mL – 70000

ng/mL) y se graficaron contra la intensidad (U.A.) emitida obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9989 demostrando la linealidad de la curva de calibración. Hay poca información acerca del uso de la espectroscopía de fluorescencia como método para cuantificar proteínas fluorescentes, no obstante, recientes estudios han reportado una curva de calibración de la proteína GFP a diferentes concentraciones (0.1 μ g/mL – 7.0 μ g/mL) demostrando la linealidad de la curva obteniendo un coeficiente de correlación de 0.9961 [46]. Utilizando PelBps-SmbP se obtuvieron 7.93 mg de RFP mientras que para CusFps-SmbP se obtuvieron 6.72 mg y para SmbPp 0.0068 mg, todos de la expresión de 1 litro de cultivo. Con estos resultados y los obtenidos anteriormente, se puede apreciar que hay una mayor producción de RFP utilizando PelBps-SmbP y CusFps-SmbP comparado con SmbPp nativa, siendo PelBps-SmbP la que más produce.

Con el propósito de probar la proteína SmbP ya optimizada con el péptido señal de PelBps para la producción de proteínas recombinantes en el periplasma de *E. coli*, se expresó el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Este factor juega un rol importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas [47]. Debido a esta capacidad, ha sido utilizado como biofarmacéutico en personas inmunocomprometidas después de recibir tratamientos quimioterapéuticos, sin embargo, se ha visto que la neutralización de este factor por auto-anticuerpos produce otro tipo de padecimientos, entre ellos, trastornos autoinmunes siendo utilizado también para tratar este tipo de enfermedades [48].

Se realizó la purificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF posterior al método de lisozima/choque osmótico en el cual se mezcló la fracción hipertónica e hipotónica con la finalidad de aumentar el rendimiento de la misma ya que se observó la presencia de la

banda de expresión en ambas fracciones (ver Figura 20). En la Figura 34 se observa el análisis por SDS-PAGE de la purificación de PelBps-SmbP-rhGM-CSF en el cual se realizó una elución por gradiente de 0 a 200 mM de imidazol obteniendo buenos niveles de pureza de la proteína. Posteriormente se realizó la remoción de PelBps-SmbP de rhGM-CSF utilizando la enzima enteroquinasa. En la Figura 37 se puede observar la diferencia en pesos moleculares posterior al corte lo cual nos indica que la proteína PelBps-SmbP fue removida satisfactoriamente del rhGM-CSF.

En estudios recientes, el rhGM-CSF ha sido expresado en el citoplasma de *E. coli* como cuerpos de inclusión, sin embargo, es necesario solubilizarlos y realizar el repliegamiento de la misma utilizando diferentes reactivos. Utilizando este método reportan haber obtenido 7 mg de rhGM-CSF soluble de 1 L de cultivo, sin embargo, utilizando este método son necesarios más pasos para la obtención final de esta proteína [48]. Utilizando nuestro sistema de proteínas de fusión con PelBps-SmbP fue posible obtener un rendimiento de 4.21 mg de proteína quimérica (PelBps-SmbP-rhGM-CSF) por 1 L de cultivo. Considerando que PelBps-SmbP es el 40% de la proteína quimérica, podemos deducir que se obtiene un rendimiento de 2.53 mg de rhGM-CSF. A pesar de que se obtiene en menor cantidad, se puede producir en menor cantidad de pasos y en su forma soluble ya que el periplasma de *E. coli* es un ambiente altamente oxidante lo cual favorece a la formación de enlaces disulfuro necesarios para que ciertas proteínas sean plegadas de manera correcta [10]. No obstante, son necesarios ensayos de actividad biológica para corroborar que la proteína se encuentra activa.

Se realizaron expresiones piloto de la construcción que contenía el gen de la enteroquinasa con el péptido señal de PelB para guiar la expresión al periplasma de *E.*

coli. En la Figura 17 se observa el análisis por SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble de la expresión siendo la proteína completamente soluble. Así mismo, se realizó otra expresión piloto con la finalidad de evaluar la extracción periplásmica con el método de lisozima/choque osmótico. En la Figura 18 se observa el análisis por SDS-PAGE de las fracciones hipertónicas e hipotónicas donde se puede apreciar la presencia de las bandas de expresión en ambas soluciones. Esto sugiere que la enteroquinasa se encuentra en su forma activa ya que, como se mencionó anteriormente, el periplasma de *E. coli* posee un ambiente altamente oxidante favoreciendo la correcta plegación de ciertas proteínas que necesiten algún enlace disulfuro. Sin embargo, es necesario un escalamiento de la expresión de la enteroquinasa y su purificación para poder realizar ensayos de actividad y poder corroborar que efectivamente es activa. La enteroquinasa ha sido expresada utilizando GST como proteína de fusión sin embargo se obtienen altos niveles de cuerpos de inclusión siendo necesaria la solubilización de estos y el replegamiento de la enzima [49]. Es por eso que realizando la expresión en el periplasma nos podría ahorrar estos pasos de solubilización de cuerpos de inclusión y el replegamiento de la proteína para hacerla activa y funcional.

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

- Se aislaron proteínas del periplasma de *E. coli* utilizando el método de lisozima/choque osmótico sin embargo puede ser necesario dializar las fracciones periplásmicas obtenidas debido a la alta viscosidad que pueden presentar.
- PelBps-SmbP y CusFps-SmbP fueron capaces de transportar proteínas al periplasma de *E. coli* lo cual se pudo confirmar mediante el método lisozima/choque osmótico y por microscopía de fluorescencia.
- PelBps-SmbP y CusFps-SmbP presentan altos niveles de expresión de RFP en el periplasma de *E. coli* comparado con SmbPp nativa.
- Se purificó PelBps-SmbP-RFP y CusFps-SmbP-RFP utilizando cromatografía de afinidad utilizando iones Ni(II) obteniendo altos niveles de pureza.
- Se realizó una curva de calibración de RFP por espectroscopía de fluorescencia con un coeficiente de correlación de 0.9989.
- PelBps-SmbP mostró mejores rendimientos de RFP comparado con CusFps-SmbP obteniendo 7.93 mg y 6.72 mg respectivamente de 1 L de cultivo.
- Se expresó el rhGM-CSF en el periplasma de *E. coli* utilizando PelBps-SmbP como proteína de fusión obteniendo buenos niveles de expresión.

- Se obtuvieron 2.53 mg de rhGM-CSF de 1 L de cultivo utilizando la proteína de fusión PelBps-SmbP, sin embargo, son necesarias ensayos de actividad biológica para comprobar su actividad.

CAPÍTULO 8

8. PERSPECTIVAS

PelBps-SmbP tiene un gran potencial para la expresión y purificación de proteínas que requieran alguna modificación post-traducciona como la formación de enlaces disulfuro para su correcto plegamiento y así puedan ser activas. Es por eso que una de las perspectivas de este proyecto es emplear a PelBps-SmbP como proteína de fusión para la expresión de proteínas de interés farmacéutico ya que una gran cantidad de biofarmacéuticos requieren este tipo de modificaciones antes mencionadas.

No obstante, es posible optimizar los niveles de expresión y los métodos de purificación con la finalidad de obtener un método más estandarizado utilizando este sistema.

PelBps-SmbP mostró una gran capacidad en la expresión del rhGM-CSF obteniendo buenos niveles de proteína soluble, sin embargo, es necesario realizar ensayos de actividad biológica utilizando una línea celular para poder corroborar que se encuentra activa.

CAPÍTULO 9

9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos que se generaron durante el presente proyecto fueron gestionados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos.

Los residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla

Tabla 13. Disposición de los residuos generados

Colector	Residuo generado
Colector A (Soluciones Salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas)	<ul style="list-style-type: none">➤ Solución amortiguadora TAE (Tris, ácido acético, EDTA)➤ TFB1 (RbCl, CaCl₂, MnCl₂, KAc, Glicerol)➤ Solución amortiguadora TGS (Tris, Glicina, SDS)➤ Solución hipertónica (Sacarosa, Tris-HCl, EDTA, Lisozima)➤ Solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl, NaCl)➤ Solución amortiguadora de elución (Tris-HCl, NaCl, Imidazol)
Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas)	<ul style="list-style-type: none">➤ Agarosa➤ Poliacrilamida
Colorantes y lugol	<ul style="list-style-type: none">➤ Azul de Coomassie

REFERENCIAS

1. Carter PJ: **Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective.** *Exp Cell Res* 2011, **317**:1261–1269.
2. Zhou Q, Jiang S, Ma K, Li C: **Expression of a novel recombinant fusion protein BVN-T β 4 and its effects on diabetic wound healing.** *J Biosci Bioeng* 2014, **118**:341–343.
3. Gopal GJ, Kumar A: **Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli.** *Protein J* 2013, **32**:419–425.
4. Islam T, Aguilar-Yañez JM, Simental-Martínez J, Ortiz-Alcaraz CI, Rito-Palomares M, Fernandez-Lahore M: **A novel strategy for the purification of a recombinant protein using ceramic fluorapatite-binding peptides as affinity tags.** *J Chromatogr A* 2014, **1339**:26–33.
5. Terpe K: **Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **60**:523–533.
6. Kamionka M: **Engineering of therapeutic proteins production in Escherichia coli.** *Curr Pharm Biotechnol* 2011, **12**:268–274.
7. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L: **Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in Escherichia coli: The novel Fh8 system.** *Front*

Microbiol 2014, **5**(FEB):1–20.

8. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD: **Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli***. *FEBS Lett* 2014, **588**:247–252.

9. Young CL, Britton ZT, Robinson AS: **Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications**. *Biotechnol J* 2012, **7**:620–634.

10. Terpe K: **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:211–22.

11. Balderas Hernández VE, Paz Maldonado LMT, Medina Rivero E, Barba de la Rosa AP, Jiménez-Bremont JF, Ordoñez Acevedo LG, De León Rodríguez A: **Periplasmic expression and recovery of human interferon gamma in *Escherichia coli***. *Protein Expr Purif* 2008, **59**:169–174.

12. Zhou Y, Zhou Y, Li J, Chen J, Yao Y, Yu L, Peng D, Wang M, Su D, He Y, Gou L: **Efficient expression, purification and characterization of native human cystatin C in *Escherichia coli* periplasm**. *Protein Expr Purif* 2015, **111**:18–22.

13. Nakamoto H, Bardwell JC a: **Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm**. *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:111–9.

14. Natale P, Brüser T, Driessen a. JM: **Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms**. *Biochim*

Biophys Acta - Biomembr 2008, **1778**:1735–1756.

15. Low KO, Muhammad Mahadi N, Md. Illias R: **Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**:3811–3826.

16. Mori H, Ito K: **The Sec protein-translocation pathway.** *Trends Microbiol* 2001, **9**:494–500.

17. Martoglio B, Dobberstein B: **Signal sequences: More than just greasy peptides.** *Trends Cell Biol* 1998, **8**(October):410–415.

18. Bloois E Van: **Biotechnological applications of periplasmic expression in *E. coli*.** *Enzym Eng* 2012, **1**:2–4.

19. Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA: **Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*.** *Biotechnol Adv* 2005, **23**:177–202.

20. Barney BM, LoBrutto R, Francisco WA: **Characterization of a Small Metal Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*†.** *Biochemistry* 2004, **43**:11206–11213.

21. Bornhorst JA, Falke JJ: **Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags.** *Methods Enzymol* 2000, **326**:245–254.

22. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X: **Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*.** *Protein Expr Purif* 2016, **118**:49–54.

23. Loftin IR, Franke S, Roberts SA, Weichsel A, Héroux A, Montfort WR, Rensing C,

McEvoy MM: **A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF.** *Biochemistry* 2005, **44**:10533–10540.

24. Cantu-Bustos JE, Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Galbraith DW, McEvoy MM, Zarate X: **Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF.** *Protein Expr Purif* 2016, **121**:61–65.

25. Jobling MG, Palmer LM, Erbe JL, Holmes RK: **Construction and Characterization of Versatile Cloning Vectors for Efficient Delivery of Native Foreign Proteins to the Periplasm of *Escherichia coli*.** *Plasmid* 1997, **38**:158–173.

26. Joly JC, Leung WS, Swartz JR: **Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:2773–7.

27. Lee SJ, Kim IC, Kim DM, Bae KH, Myung S: **High level secretion of recombinant staphylokinase into periplasm of *Escherichia coli*.** 1998, **20**:113–116.

28. Choi JH, Jeong KJ, Kim SC, Lee SY: **Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus sp.* endoxylanase signal sequence.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **53**:640–5.

29. Schierle CF, Berkmen M, Huber D, Kumamoto C, Boyd D, Beckwith J: **The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway.** *J Bacteriol* 2003, **185**:5706–13.

30. Ramanan RN, Tan JS, Mohamed MS, Ling TC, Tey BT, Ariff AB: **Optimization of**

osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- α 2b from *Escherichia coli* using response surface method. *Process Biochem* 2010, **45**:196–202.

31. Takemori D, Yoshino K, Eba C, Nakano H, Iwasaki Y: **Extracellular production of phospholipase A2 from *Streptomyces violaceoruber* by recombinant *Escherichia coli*.** *Protein Expr Purif* 2012, **81**:145–150.

32. Cao W, Li H, Zhang J, Li D, Acheampong DO, Chen Z, Wang M: **Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: antiangiogenic activity study.** *Protein Expr Purif* 2013, **90**:55–66.

33. Samant S, Gupta G, Karthikeyan S, Haq SF, Nair A, Sambasivam G, Sukumaran S: **Effect of codon-optimized *E. coli* signal peptides on recombinant *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase periplasmic localization, yield and activity.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014, **41**:1435–42.

34. Le Y, Wang H: **High-level soluble expression of a thermostable xylanase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* via fusion with OsmY protein.** *Protein Expr Purif* 2014, **99**:1–5.

35. Dow B a, Tatulian S a, Davidson VL: **Use of the amicyanin signal sequence for efficient periplasmic expression in *E. coli* of a human antibody light chain variable domain.** *Protein Expr Purif* 2015, **108**:9–12.

36. Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D: **PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(Web Server issue):W375-9.

37. Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL: **Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(SUPPL.2):429–432.
38. Nielsen H, Krogh A: **Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model.** *Intell Syst Mol Biol* 1998, **6**:122–130.
39. Neu HC, Heppel LA: **The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts.** *JBiolChem* 1965, **240**:3685–3692.
40. Witholt B, Heerikhuizen H van, Leij L De: **How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane?** *Biochim Biophys Acta* 1976, **443**:534–544.
41. French C, Keshavarz-Moore E, Ward JM: **Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm.** *Enzyme Microb Technol* 1996, **19**:332–338.
42. Pierce JJ, Turner C, Keshavarz-Moore E, Dunnill P: **Factors determining more efficient large-scale release of a periplasmic enzyme from *E. coli* using lysozyme.** *J Biotechnol* 1997, **58**:1–11.
43. Sockolosky JT, Szoka FC: **Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone.** *Protein Expression and Purification* 2013:129–135.
44. Cantu-Bustos JE, Cano del Villar KD, Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X: **Recombinant protein production data after expression in the bacterium *Escherichia coli*.** *Data Br* 2016, **7**:502–508.

45. Santini CL, Bernadac A, Zhang M, Chanal A, Ize B, Blanco C, Wu LF: **Translocation of Jellyfish Green Fluorescent Protein via the Tat System of *Escherichia coli* and Change of Its Periplasmic Localization in Response to Osmotic Up-shock.** *J Biol Chem* 2001, **276**:8159–8164.
46. He XM, Yuan BF, Feng YQ: **Facial synthesis of nickel(II)-immobilized carboxyl cotton chelator for purification of histidine-tagged proteins.** *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2016.
47. Rastgar Jazii F, Karkhane AA, Yakhchali B, Fatemi SS, Deezagi A: **A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*.** *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007, **856**:214–221.
48. Thomson CA, Olson M, Jackson LM, Schrader JW: **A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF.** *PLoS One* 2012, **7**.
49. Tan H, Wang J, Zhao Z (Kent): **Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in *Escherichia coli*.** *Protein Expr Purif* 2007, **56**:40–47.